

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PRISCILA KREBSBACH KANDALSKI

EFEITOS FISIOLÓGICOS EM NOTOTENÍDEOS ANTÁRTICOS SUBMETIDOS AO  
ESTRESSE TÉRMICO DE CURTO E LONGO PRAZO

CURITIBA

2018

PRISCILA KREBSBACH KANDALSKI

EFEITOS FISIOLÓGICOS EM NOTOTENÍDEOS ANTÁRTICOS SUBMETIDOS AO  
ESTRESSE TÉRMICO DE CURTO E LONGO PRAZO

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular, no curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Lucélia Donatti

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas  
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Kandalski, Priscila Krebsbach

Efeitos fisiológicos em nototenídeos antárticos submetidos ao estresse térmico de curto e longo prazo. / Priscila Krebsbach Kandalski. – Curitiba, 2018.

187 f. : il. ; 30cm.

Orientadora: Lucélia Donatti

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Peixe - Antártida. 2. Biomarcadores. 3. Metabolismo. I. Título II. Donatti, Lucélia. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 597.0924



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular  
Setor de Ciências Biológicas  
Universidade Federal do Paraná

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Tese de Doutorado de PRISCILA KREBSBACH KANDALSKI intitulada "Efeitos fisiológicos em nototenídeos antárticos submetidos ao estresse térmico de curto e longo prazo", após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de Doutora está sujeita à homologação pelo Colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 02 de março de 2018.

Prof. Dra. Lucelia Donatti  
Orientadora e presidente da banca

Universidade Federal do Paraná – UFPR (avaliador interno)

Prof. Dra. Tatiana Herrerias

Faculdade Guairacá- Guarapuava-PR (avaliador externo)

Prof. Dra. Silvia Romão

Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS (avaliador externo)

Prof. Dra. Maritana Mela Prodócimo

Universidade Federal do Paraná – UFPR (avaliador interno)

Prof. Dra. Viviane Prodócimo

Universidade Federal do Paraná – UFPR (avaliador externo)



Dedico este trabalho a todos aqueles que acreditam na Ciência e na Educação como pilares de um mundo melhor.

## **AGRADECIMENTOS**

Desejo aqui expressar o meu mais profundo agradecimento a todos aqueles que tornaram a realização deste trabalho possível. Ao longo desses anos (nos quais incluo a minha iniciação científica e o mestrado) percebi que a execução de um trabalho científico não é uma tarefa a ser seguida sozinha. Inúmeros esforços resultam no desenvolvimento e aprimoramento do ser cientista...

Por isso, gostaria de agradecer imensamente à minha orientadora Prof. Dra Lucélia Donatti que em 2008 me deu a oportunidade de começar a trilhar um caminho pela vida científica. Todo o seu apoio, incentivo, ensinamentos e disponibilidade demonstrada em todas as etapas levaram à concretização deste trabalho e sempre serão lembrados ao longo da minha jornada científica. Palavras não são suficientes para expressar minha gratidão por todo o encorajamento.

Agradeço às meninas do laboratório Thaylise, Mariana, Tânia, Letícia, Angela e Elen, e ao Douglas, por toda a ajuda e por proporcionarem um excelente ambiente de trabalho. À Cintia pelo entusiasmo e a leveza que encara a vida e o mundo científico. É inspirador! Agradeço especialmente minha amiga e irmã-científica Maria Rosa pelas “aventuras científicas”, paciência e conversas que jamais irão cair no meu esquecimento.

Ao Prof. Dr. Luís Fernando Fávaro pelas conversas e a imensa ajuda na confecção de um dos artigos científicos.

A Prof. Dra Tatiana Herrerias por compartilhar seus conhecimentos em bioquímica e por ajudar a montar esse grande “quebra-cabeça”.

A Prof. Dra Tania Zaleski e ao Prof. Dr. Maurício pelo auxílio imprescindível nas análises estatísticas.

Aos membros da banca de avaliação dos relatórios anuais, Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira, Prof. Dra Maritana Mela Prodocimo e Prof. Dra Viviane Prodocimo pelos seus ensinamentos e sugestões pertinentes.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFPR e aos professores que contribuíram para a minha formação.

Ao Programa Antártico Brasileiro, Marinha do Brasil e Força Aérea Brasileira, pelo apoio logístico para a execução dos experimentos na Estação Antártica Comandante Ferraz durante as Expedições Antárticas.

Ao INCT-APA pelo apoio financeiro para o desenvolvimento da pesquisa.

À CAPES pela concessão da bolsa.

À minha família amada, em especial aos meus pais Aloísio e Jacqueline, e minha irmã Letícia, que sempre incentivaram e apoiaram as minhas escolhas. Por todo ao amor e carinho que me dão. Ao meu esposo Eduardo pelo apoio, compreensão e companheirismo, em especial na reta final do doutorado.

Agradeço imensamente às professoras Dra Maritana Mela Prodocimo, Dra Silvia Romão, Dra Tatiana Herrerias e Dra Viviane Prodocimo por aceitarem prontamente o convite para participar da banca examinadora da presente tese, e pelas preciosas contribuições para a melhoria do trabalho.

E por fim, agradeço ao mais importante, à Deus, pela vida e pelo dom da perseverança.

## RESUMO

Peixes antárticos são altamente estenotérmicos apresentando adaptações fisiológicas que permitem a sobrevivência nas águas frias e estáveis (-1,8 a +3°C) do oceano Antártico. A temperatura é um fator abiótico que afeta os organismos ectotérmicos devido a sua influência nas reações enzimáticas e na estabilidade das macromoléculas. Por isso, ao considerar as tendências de aquecimento na região da Península Antártica questionamentos são levantados a respeito da flexibilidade e dos mecanismos fisiológicos desencadeados para a restauração da homeostase em organismos antárticos submetidos ao estresse térmico. Dessa forma, esta tese teve como objetivo verificar os efeitos fisiológicos do estresse térmico (8°C), de longo (90 dias) e curto (2 a 144 horas) prazo, em nototenídeos antárticos presentes na Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Península Antártica. Ao analisar os efeitos do estresse térmico de longo prazo em *N. rossii*, constata-se que, apesar de não haver a alteração do fator de condição, há indícios de aumento da demanda energética na temperatura de 8°C. Entre as alterações, observou-se a hiperglicemia, a redução do índice hepatossomático, a mobilização do estoque lipídico nos tecidos hepático e muscular, o aumento da atividade da citrato sintase no fígado, o aumento do potencial gliconeogênico no fígado, rim, brânquia, coração e músculo, bem como aumento do potencial anaeróbico em todos os tecidos (excetuando-se as brânquias). A não modulação ou ainda a redução dos níveis de atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST) indicam que os níveis presentes são suficientes para condição de 8°C e 90 dias. Nos experimentos de curto prazo, observou-se que no tecido renal de *N. rossii*, os níveis de atividade das enzimas glicolíticas e da via do ácido cítrico foram modulados nas primeiras 12h em 8°C. Enquanto, *N. coriiceps* apresentou valores semelhantes aos do controle a partir de 6h de experimento. Acredita-se que a manutenção do metabolismo de carboidratos no rim de *N. coriiceps* ocorreu devido ao consumo das reservas de glicogênio renais. Em *N. rossii*, a redução dos níveis de atividade da CAT, GST, glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR) nas primeiras horas de estresse térmico possivelmente contribuíram para o aumento da LPO em 72h. Já em *N. coriiceps*, não se observaram danos lipídicos nem proteicos. Através das análises plasmáticas constatou-se o aumento do cortisol em *N. coriiceps* expostas ao aumento térmico, o que desencadeou respostas secundárias a fim de subsidiar o aumento da demanda energética. Como a hiperglicemia em 6, 12 e 72h, a redução dos níveis de proteína total em 6 e 144h e de triglicérides em 144h. Ainda em *N. coriiceps*, observou-se o aumento da atividade da SOD e da CAT plasmáticas. Em *N. rossii*, não se verificou o efeito clássico de resposta primária ao estresse, contudo a hiperglicemia transiente nos tempos de 6 e 12h possivelmente ocorreu pelo efeito das catecolaminas. Diante dos resultados obtidos nesta tese verificamos que as respostas observadas são tempo-, tecido- e espécie-dependentes. Sendo *N. coriiceps* um potencial bioindicador da Baía do Almirantado, por ser mais sensível fisiologicamente ao estresse térmico do que *N. rossii*.

Palavras-chave: Peixes antárticos. Notothenidae. Temperatura. Aquecimento. Metabolismo. Biomarcadores.



## ABSTRACT

Antarctic fish are highly stenothermic exhibiting physiological adaptations that allow survival in the cold and stable waters (-1.8 to + 3°C) of the Antarctic Ocean. Temperature is an abiotic factor that affects ectothermal organisms due to its influence on the enzymatic reactions and the stability of the macromolecules. Therefore, when considering warming trends in the region of the Antarctic Peninsula, questions are raised regarding the flexibility and physiological mechanisms triggered for the restoration of homeostasis in Antarctic organisms subjected to thermal stress. The objective of this thesis was to verify the physiological effects of thermal stress (8°C), in short (2 to 144 hours) and long (90 days) term, in Antarctic nototheniids present in Almirantado Bay, King George Island, Antarctic Peninsula. Among the effects of long-term thermal stress on *N. rossii*, it was observed that, although there is no change in the condition factor, there is evidence of an increase in energy demand at 8°C. Which are demonstrated by hyperglycemia, hepatosomatic index reduction, mobilization of lipid stores in the hepatic and muscular tissues, increased activity of citrate synthase in the liver, increased gluconeogenic potential in the liver, kidney, gill, heart and muscle, as well as increased anaerobic potential in all tissues (except gills). Unchanged or reduced activity levels of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione-s-transferase (GST) indicate that the levels present are possibly sufficient at 8°C and 90 days. In the short-term experiments, it was observed that in the renal tissue of *N. rossii*, the activity levels of the glycolytic enzymes and the citric acid pathway were modulated in the first 12 hours at 8°C. While *N. coriiceps* presented values similar to those of the control from 6h of experiment. It is believed that the maintenance of carbohydrate metabolism in the *N. coriiceps* kidney occurred due to the consumption of renal glycogen stores. Reduction of CAT, GST, glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR) activity levels in the first hours of thermal stress possibly contributed to an increase in LPO in 72h-group of *N. rossii*. In *N. coriiceps*, no lipid or protein damage was observed. Plasma analyzes revealed cortisol increase in *N. coriiceps* exposed to thermal increase, which triggered secondary responses in order to subsidize the increase in energy demand. As hyperglycemia at 6, 12 and 72h, reduction of total protein levels in 6 and 144h and of triglycerides in 144h. In *N. coriiceps*, increased activity of plasma SOD and CAT was observed. In *N. rossii*, the classic effect of the primary response to stress was not found, however, transient hyperglycemia at 6 and 12h was possibly due to the release of catecholamines. In view of the results obtained in this thesis we verified that the observed responses are time-, tissue- and species-dependent. *N. coriiceps* is a potential bioindicator of Admiralty Bay for being more physiologically sensitive to thermal stress than *N. rossii*.

Keywords: Antarctic fish. Notothenidae. Temperature. Warming. Metabolism. Biomarkers.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### INTRODUÇÃO GERAL

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CONTINENTE ANTÁRTICO E DAS PRINCIPAIS CORRENTES DO OCEANO ANTÁRTICO.....	21
FIGURA 2 - <i>Notothenia rossii</i> E <i>Notothenia coriiceps</i> .....	22
FIGURA 3 - DISTRIBUIÇÃO DE <i>Notothenia rossii</i> .....	23
FIGURA 4 - DISTRIBUIÇÃO DE <i>Notothenia coriiceps</i> .....	23
FIGURA 5 - LOCAL DE ESTUDO: BAÍA DO ALMIRANTADO, ILHA REI GEORGE, PENÍNSULA ANTÁRTICA, ANTÁRTICA.....	25

### CAPÍTULO I

FIGURA 1 - ÍNDICES BIOLÓGICOS DE <i>Notothenia rossii</i> .....	40
FIGURA 2 - CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATOS ENERGÉTICOS NOS TECIDOS HEPÁTICO E MUSCULAR DE <i>Notothenia rossii</i> .....	41
FIGURA 3 - COMPOSIÇÃO PLASMÁTICA DE <i>Notothenia rossii</i> .....	43
FIGURA 4 - ESQUEMA DOS EFEITOS FISIOLÓGICOS OBSERVADOS NO PLASMA E TECIDOS DE <i>N. ROSSII</i> SUBMETIDA À TEMPERATURA DE 8°C POR 90 DIAS.....	46

### CAPÍTULO II

FIGURA 1 - CONCENTRAÇÕES DE GLICOGÊNIO NOS RINS DE <i>Notothenia rossii</i> E <i>Notothenia coriiceps</i> SOB ESTRESSE TÉRMICO.....	81
FIGURA 2 - CONCENTRAÇÕES DE LACTATO NOS RINS DE <i>Notothenia rossii</i> E <i>Notothenia coriiceps</i> SOB ESTRESSE TÉRMICO.....	82
FIGURA 3 - CONCENTRAÇÕES DE PIRUVATO NOS RINS DE <i>Notothenia rossii</i> E <i>Notothenia coriiceps</i> SOB ESTRESSE TÉRMICO.....	83
FIGURA 4 - NÍVEIS DE ATIVIDADE DA HEXOKINASE (HK) NOS RINS DE <i>Notothenia rossii</i> E <i>Notothenia coriiceps</i> SOB ESTRESSE TÉRMICO.....	84
FIGURA 5 - NÍVEIS DE ATIVIDADE DA FOSFOFRUTOQUINASE (PFK) NOS RINS DE <i>Notothenia rossii</i> E <i>Notothenia coriiceps</i> SOB ESTRESSE TÉRMICO.....	85
FIGURA 6 - NÍVEIS DE ATIVIDADE DA CITRATO SINTASE (CS) NOS RINS DE <i>Notothenia rossii</i> E <i>Notothenia coriiceps</i> SOB ESTRESSE TÉRMICO.....	86

FIGURA 7 - NÍVEIS DE ATIVIDADE DA MALATO DESIDROGENASE (MDH) NOS RINS DE <i>Notothenia rossii</i> E <i>Notothenia coriiceps</i> SOB ESTRESSE TÉRMICO.....	86
FIGURA 8 - NÍVEIS DE ATIVIDADE DA LACTATO DESIDROGENASE (LDH) NOS RINS DE <i>Notothenia rossii</i> E <i>Notothenia coriiceps</i> SOB ESTRESSE TÉRMICO.....	87
FIGURA 9 - NÍVEIS DE ATIVIDADE DA GLICOSE-6-FOSFATASE (MDH) NOS RINS DE <i>Notothenia rossii</i> E <i>Notothenia coriiceps</i> SOB ESTRESSE TÉRMICO.....	88
FIGURA 10 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS RENAL EM <i>Notothenia rossii</i> SUBMETIDOS AO ESTRESSE TÉRMICO. A em 2h e B em 6h.....	90
FIGURA 11 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS RENAL EM <i>Notothenia coriiceps</i> SUBMETIDOS AO ESTRESSE TÉRMICO.....	91
FIGURA 12 - NÍVEIS DE ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) NOS RINS DE <i>Notothenia rossii</i> E <i>Notothenia coriiceps</i> SOB ESTRESSE TÉRMICO.....	92
FIGURA 13 - NÍVEIS DE ATIVIDADE DA CATALASE (CAT) NOS RINS DE <i>Notothenia rossii</i> E <i>Notothenia coriiceps</i> SOB ESTRESSE TÉRMICO.....	93
FIGURA 14 - NÍVEIS DE ATIVIDADE DA GLUTATIONA-S-TRANSFERASE (GST) NOS RINS DE <i>Notothenia rossii</i> E <i>Notothenia coriiceps</i> SOB ESTRESSE TÉRMICO.....	93
FIGURA 15 - NÍVEIS DE ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE (GPx) NOS RINS DE <i>Notothenia rossii</i> E <i>Notothenia coriiceps</i> SOB ESTRESSE TÉRMICO.....	94
FIGURA 16 - NÍVEIS DE ATIVIDADE DA GLUTATIONA REDUTASE (GR) NOS RINS DE <i>Notothenia rossii</i> E <i>Notothenia coriiceps</i> SOB ESTRESSE TÉRMICO.....	95
FIGURA 17 - NÍVEIS DE ATIVIDADE DA GLUCOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE (G6PDH) NOS RINS DE <i>Notothenia rossii</i> E <i>Notothenia coriiceps</i> SOB ESTRESSE TÉRMICO.....	96
FIGURA 18 - CONCENTRAÇÃO DE TIÓIS NÃO PROTEICOS (GSH) NOS RINS DE <i>Notothenia rossii</i> E <i>Notothenia coriiceps</i> SOB ESTRESSE TÉRMICO.....	98
FIGURA 19 - NÍVEIS DE MALONDIALDEÍDO (MDA) NOS RINS DE <i>Notothenia rossii</i> E <i>Notothenia coriiceps</i> SOB ESTRESSE TÉRMICO.....	99
FIGURA 20 - NÍVEIS DE CARBONILAÇÃO PROTEICA (CP) NOS RINS DE <i>Notothenia rossii</i> E <i>Notothenia coriiceps</i> SOB ESTRESSE TÉRMICO.....	99

FIGURA 21 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE RENAL EM <i>Notothenia rossii</i> SUBMETIDOS AO ESTRESSE TÉRMICO.....	101
FIGURA 22 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE RENAL EM <i>Notothenia coriiceps</i> SUBMETIDOS AO ESTRESSE TÉRMICO.....	101

### **CAPÍTULO III**

FIGURA 1 - NÍVEIS DO CORTISOL PLASMÁTICO DE <i>Notothenia coriiceps</i> (NC) E <i>Notothenia rossii</i> (NR) SUBMETIDOS AO ESTRESSE TÉRMICO.....	129
FIGURA 2 - NÍVEIS DOS PARÂMETROS METABÓLICOS PLASMÁTICOS DE <i>Notothenia coriiceps</i> (NC) E <i>Notothenia rossii</i> (NR) SUBMETIDOS AO ESTRESSE TÉRMICO.....	132
FIGURA 3 - NÍVEIS DOS PARÂMETROS IÔNICOS PLASMÁTICOS DE <i>Notothenia coriiceps</i> (NC) E <i>Notothenia rossii</i> (NR) SUBMETIDOS AO ESTRESSE TÉRMICO.....	135
FIGURA 4 - NÍVEIS DOS PARÂMETROS DA DEFESA ANTIOXIDANTE PLASMÁTICOS DE <i>Notothenia coriiceps</i> (NC) E <i>Notothenia rossii</i> (NR) SUBMETIDOS AO ESTRESSE TÉRMICO.....	137
FIGURA 5 - NÍVEIS DA PARÂMETROS DA ATIVIDADE DA $Na^+-K^+-ATPase$ RENAL E BRANQUIAL DE <i>Notothenia coriiceps</i> (NC) E <i>Notothenia rossii</i> (NR) SUBMETIDOS AO ESTRESSE TÉRMICO.....	138

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

TABELA 1 - VALORES DA MÉDIA $\pm$ ERRO-PADRÃO DA MÉDIA DOS NÍVEIS DE ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO METABOLISMO ENERGÉTICO DE <i>Notothenia rossii</i> .....	45
TABELA 2 - VALORES DA MÉDIA $\pm$ ERRO-PADRÃO DA MÉDIA DOS NÍVEIS DE ATIVIDADE DAS ENZIMAS DA DEFESA ANTIOXIDANTE DE <i>Notothenia rossii</i> .....	45

### CAPÍTULO II

TABELA 1 - RESULTADOS DO TESTE DE ANOVA (DUAS-VIAS) PARA OS INTERMEDIÁRIOS METABÓLICOS RENAIIS DE <i>Notothenia rossii</i> e <i>Notothenia coriiceps</i> .....	83
TABELA 2 - VALORES MÉDIO $\pm$ ERRO-PADRÃO DA MÉDIA DOS INTERMEDIÁRIOS METABÓLICOS RENAIIS DE <i>Notothenia rossii</i> E <i>Notothenia coriiceps</i> .....	83
TABELA 3 - RESULTADOS DO TESTE DE ANOVA (DUAS-VIAS) PARA AS ENZIMAS DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS RENAL DE <i>Notothenia rossii</i> E <i>Notothenia coriiceps</i> .....	88
TABELA 4 - VALORES DA MÉDIA $\pm$ ERRO-PADRÃO DA MÉDIA DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS RENAL DE <i>Notothenia rossii</i> E <i>Notothenia coriiceps</i> .....	89
TABELA 5 - RESULTADOS DO TESTE DE ANOVA (DUAS-VIAS) PARA AS ENZIMAS DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE RENAL DE <i>Notothenia rossii</i> E <i>Notothenia coriiceps</i> .....	96
TABELA 6 - VALORES DA MÉDIA $\pm$ ERRO-PADRÃO DA MÉDIA DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE RENAL DE <i>Notothenia rossii</i> E <i>Notothenia coriiceps</i> .....	97
TABELA 7 - RESULTADOS DO TESTE DE ANOVA (DUAS-VIAS) PARA AS CONCENTRAÇÕES DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH), MALONDIALDEÍDO (MDA) E CARBONILAÇÃO PROTEICA (CP) RENAL DE <i>Notothenia rossii</i> E <i>Notothenia coriiceps</i> .....	100

TABELA 8 - VALORES DA MÉDIA $\pm$ ERRO-PADRÃO DA MÉDIA DAS CONCENTRAÇÕES DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) E DOS MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS: CARBONILAÇÃO PROTEICA (CP) E MALONDIALDEÍDO (MDA) RENAL DE <i>Notothenia rossii</i> E <i>Notothenia coriiceps</i> .....	100
TABELA 9 - RESUMO DAS ALTERAÇÕES ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS NO RIM DE <i>N. rossii</i> (NR) E <i>N. coriiceps</i> (NC) SUBMETIDOS AO ESTRESSE TÉRMICO (8°C).....	102

### CAPÍTULO III

TABELA 1 - RESULTADO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA MULTIVARIADA (MANOVA) PARA OS EFEITOS DA TEMPERATURA E TEMPO NOS GRUPOS DE BIOMARCADORES (ENDÓCRINO, METABÓLICOS, IÔNICOS, DEFESA ANTIOXIDANTE, ATIVIDADE da $Na^+-K^+$ -ATPASE) ANALISADOS EM <i>Notothenia coriiceps</i> (NC) e <i>Notothenia rossii</i> (NR).....	128
TABELA 2 - NÍVEIS DO CORTISOL PLASMÁTICO DE <i>Notothenia coriiceps</i> (NC) E <i>Notothenia rossi</i> (NR) SUBMETIDOS AO ESTRESSE TÉRMICO (MÉDIA $\pm$ ERRO PADRÃO DA MÉDIA).....	129
TABELA 3 - NÍVEIS DOS PARÂMETROS METABÓLICOS PLASMÁTICOS DE <i>Notothenia coriiceps</i> (NC) E <i>Notothenia rossi</i> (NR) SUBMETIDOS AO ESTRESSE TÉRMICO (MÉDIA $\pm$ ERRO PADRÃO DA MÉDIA).....	133
TABELA 4 - NÍVEIS DOS PARÂMETROS IÔNICOS DO PLASMA DE <i>Notothenia coriiceps</i> (NC) E <i>Notothenia rossi</i> (NR) SUBMETIDOS AO ESTRESSE TÉRMICO (MÉDIA $\pm$ ERRO PADRÃO DA MÉDIA).....	136
TABELA 5 - NÍVEIS DOS PARÂMETROS DA DEFESA ANTIOXIDANTE DO PLASMA DE <i>Notothenia coriiceps</i> (NC) E <i>Notothenia rossi</i> (NR) SUBMETIDOS AO ESTRESSE TÉRMICO (MÉDIA $\pm$ ERRO PADRÃO DA MÉDIA).....	137
TABELA 6 - NÍVEIS DA ATIVIDADE DA $Na^+-K^+$ -ATPASE RENAL E BRANQUIAL DE <i>Notothenia coriiceps</i> (NC) E <i>Notothenia rossi</i> (NR) SUBMETIDOS AO ESTRESSE TÉRMICO (MÉDIA $\pm$ ERRO PADRÃO DA MÉDIA).....	139

## LISTA DAS PRINCIPAIS SIGLAS<sup>1</sup>

AMP	– adenosina monofosfato
ATP	– adenosina trifosfato.
CAT	– catalase
CS	– citrato sintase
CTmax	– temperatura crítica máxima (do inglês <i>Critical thermal maximum</i> )
DTNB	– 5'5-Ditiobis (2-nitrobenzoico ácido)
EACF	– Estação Antártica Comandante Ferraz
EDTA	– ácido etileno diamino tetracético (do inglês <i>Ethylenediaminetetracetic Acid</i> )
EPM	– erro padrão da média
EROs	– espécies reativas de oxigênio
G6Pase	– glicose-6-fosfatase
G6PDH	– glucose-6-fosfato desidrogenase
GPx	– glutathione peroxidase
GR	– glutathione reductase
GSH	– glutathione reduzida
GSSG	– glutathione dissulfeto (glutathione oxidada)
GST	– glutathione-S-transferase
HCl	– ácido clorídrico
HK	– hexoquinase
HSI	– índice hepatossomático (do inglês <i>hepatosomatic index</i> )
K	– fator de condição
LDH	– lactato desidrogenase
LPO	– peroxidação lipídica (do inglês <i>lipid peroxidation</i> )
MANOVA	– análise multivariada da variância
MDA	– malondialdeído
MDH	– malato desidrogenase
NADH	– nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADP	– nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADP <sup>+</sup>	– nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada.

---

<sup>1</sup> Siglas citadas apenas uma vez ou em sequência próxima no texto não estão listadas

NADPH	– nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NBT	– azul de nitrotetrazólio
NKA	– sódio e potássio adenosina trifosfatase ( $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ )
PBS	– tampão fosfato salino (do inglês <i>phosphate buffer saline</i> )
PC	– carbonilação de proteínas (do inglês <i>protein carbonyl content</i> ou <i>protein carbonylation</i> )
PFK	– fosfofrutoquinase
Pi	– fosfato inorgânico
SOD	– superóxido dismutase
TCA	– ciclo dos ácidos tricarbóxicos (do inglês <i>tricarboxylic acid cycle</i> )
U	– unidade internacional



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	21
1.1	O AMBIENTE ANTÁRTICO E OS NOTOTENÍDEOS.....	21
1.2	TEMPERATURAS ELEVADAS E OS IMPACTOS FISIOLÓGICOS EM PEIXES ANTÁRTICOS .....	24
	<b>CAPÍTULO I: Efeitos do estresse térmico a longo prazo no nototenídeo antártico <i>Notothenia rossii</i></b> .....	29
	<b>RESUMO</b> .....	29
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	30
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	34
2.1	GERAL.....	34
2.2	ESPECÍFICOS.....	34
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	35
3.1	DECLARAÇÃO DE ÉTICA .....	35
3.2	COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS E ARRANJO EXPERIMENTAL	35
3.3	MÉTODOS ANALÍTICOS .....	36
3.3.1	Determinação dos índices biológicos .....	36
3.3.2	Determinação da concentração de substratos energéticos .....	36
3.3.3	Determinação da composição plasmática .....	37
3.3.4	Determinação das atividades enzimáticas .....	37
3.3.4.1	Ensaio para a atividade das enzimas do metabolismo energético.....	38
3.3.4.2	Ensaio para a atividade das enzimas da defesa antioxidante .....	39
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	39
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	40
4.1	DETERMINAÇÃO DOS ÍNDICES BIOLÓGICOS .....	40
4.2	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATOS ENERGÉTICOS NOS TECIDOS HEPÁTICO E MUSCULAR .....	40
4.3	DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO PLASMÁTICA .....	42
4.4	DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS .....	43
4.4.1	Atividades das enzimas do metabolismo energético .....	43
4.4.2	Atividades das enzimas da defesa antioxidante .....	44
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	47

5.1	EFEITOS DA ACLIMATAÇÃO A 8°C NOS ÍNDICES BIOLÓGICOS.....	47
5.2	EFEITOS DA ACLIMATAÇÃO A 8°C NA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATOS ENERGÉTICOS NOS TECIDOS HEPÁTICO E MUSCULAR E NA COMPOSIÇÃO PLASMÁTICA.....	49
5.3	EFEITOS DA ACLIMATAÇÃO A 8°C NA ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO METABOLISMO ENERGÉTICO.....	52
5.4	EFEITOS DA ACLIMATAÇÃO A 8°C NAS ATIVIDADES DAS ENZIMAS DA DEFESA ANTIOXIDANTE.....	53
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>55</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>56</b>
<b>CAPÍTULO II: Avaliação do efeito do estresse térmico agudo no tecido renal dos nototenídeos antárticos <i>Notothenia rossii</i> e <i>Notothenia coriiceps</i> através de biomarcadores fisiológicos e bioquímicos</b> .....		
	<b>RESUMO</b> .....	<b>68</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>70</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>73</b>
2.1	GERAL.....	73
2.2	ESPECÍFICOS.....	73
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>74</b>
3.1	DECLARAÇÃO DE ÉTICA .....	74
3.2	COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS E ARRANJO EXPERIMENTAL	74
3.3	MÉTODOS ANALÍTICOS .....	75
3.3.1	Determinação dos intermediários metabólicos renais .....	75
3.3.2	Determinação da atividade das enzimas do metabolismo energético de carboidratos renal.....	76
3.3.3	Determinação da atividade das enzimas do sistema de defesa antioxidante renal .....	78
3.3.4	Determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH) e marcadores de danos oxidativos renais.....	79
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	80
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>81</b>
4.1	EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO NA CONCENTRAÇÃO DOS INTERMEDIÁRIOS METABÓLICOS RENAIIS .....	81

4.2	EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO NOS NÍVEIS DE ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS RENAL .....	84
4.3	EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO NOS NÍVEIS DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE RENAL.....	92
4.4	EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO NA CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) E MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS RENAI.....	97
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>103</b>
5.1	EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS RENAL.....	103
5.2	EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO NO SISTEMA ANTIOXIDANTE RENAL.....	105
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>107</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>108</b>
	<b>CAPÍTULO III: O efeito do estresse térmico de curto prazo no perfil bioquímico plasmático de nototenídeos antárticos .....</b>	<b>116</b>
	<b>RESUMO.....</b>	<b>116</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>117</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>120</b>
2.1	GERAL.....	120
2.2	ESPECÍFICOS.....	120
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>121</b>
3.1	DECLARAÇÃO DE ÉTICA .....	121
3.2	COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS E ARRANJO EXPERIMENTAL.....	121
3.3	MÉTODOS ANALÍTICOS .....	122
3.3.1	Determinação do parâmetro endócrino .....	122
3.3.2	Determinação dos parâmetros metabólicos do plasma.....	122
3.3.3	Determinação dos parâmetros iônicos do plasma.....	124
3.3.4	Determinação dos parâmetros da defesa antioxidante do plasma .....	125
3.3.5	Determinação da $Na^+ - K^+ - ATPase$ renal e branquial.....	126
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	126
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>128</b>
4.1	EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO NO PARÂMETRO ENDÓCRINO.....	128

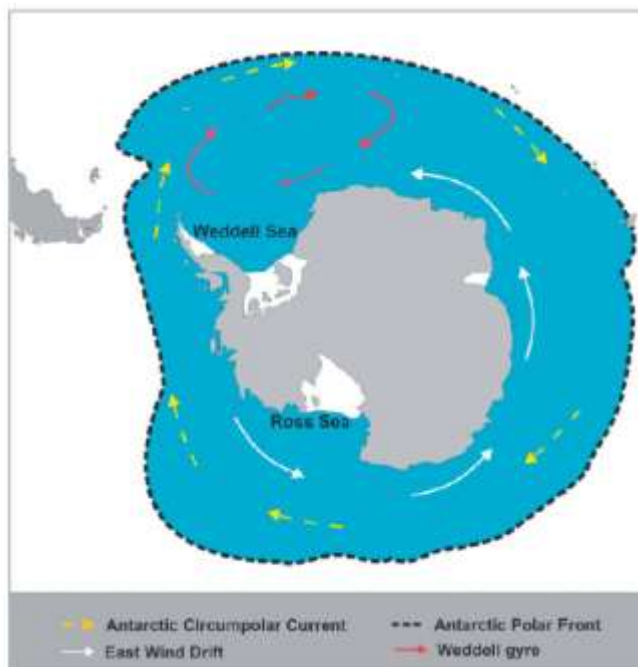
4.2	EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO NOS PARÂMETROS METABÓLICOS DO PLASMA .....	130
4.3	EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO NOS PARÂMETROS IÔNICOS DO PLASMA.....	134
4.4	EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO NOS PARÂMETROS DA DEFESA ANTIOXIDANTE DO PLASMA.....	136
4.5	EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO NA $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPASE}$ RENAL E BRANQUIAL.....	138
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>140</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>148</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>149</b>
	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>160</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>162</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 O AMBIENTE ANTÁRTICO E OS NOTOTENÍDEOS

Entre 34 a 37 milhões de anos atrás, o surgimento da passagem de Drake entre a Antártica e a América do Sul levou a formação de uma grande bacia abissal com mais de 4000 m de profundidade, tornando a Antártica isolada de todos os outros continentes. O fluxo contínuo de massas de águas frias resultou no aparecimento da Corrente Circumpolar Antártica (CCA), entre 23 a 25 milhões de anos atrás, isolando o continente antártico tanto climática quanto biologicamente (BARRETT, 2003) (Figura 1). Isso se reflete na barreira biogeográfica natural denominada Zona de Convergência Antártica (ZCA) (BARGELLONI; MARCATO; PATARNELLO, 1998; FALCO; ZAMBIANCHI, 2011), que permitiu o desenvolvimento de um ecossistema antártico estável, com a presença de espécies altamente estenotérmicas e endêmicas (KOCK, 1992; CHENG et al., 2003; ARNTZ; BREY; GALLARDO, 2005; DUHAMEL et al., 2014).

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CONTINENTE ANTÁRTICO E DAS PRINCIPAIS CORRENTES DO OCEANO ANTÁRTICO



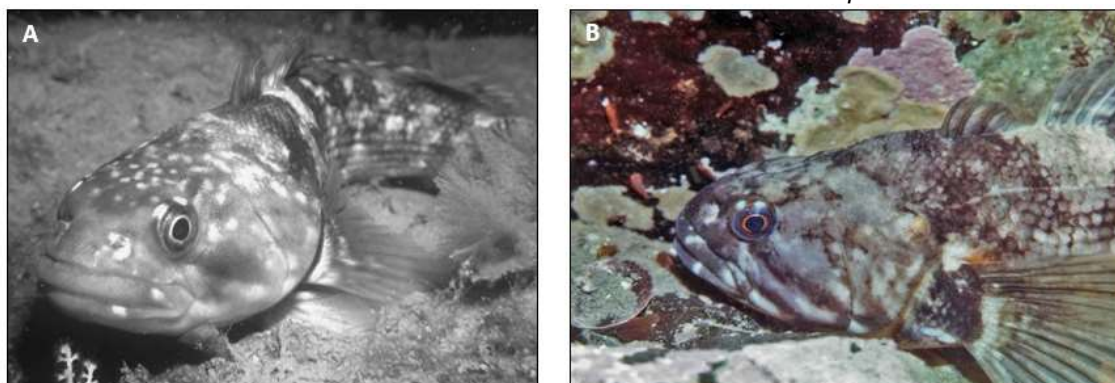
FONTE: PATARNELLO et al. (2011).

A ictiofauna antártica representa aproximadamente 2,06% da ictiofauna marinha conhecida (DUHAMEL et al., 2014) e é extremamente bem adaptada às baixas temperaturas, a presença de gelo no mar, a redução de habitat e a grande

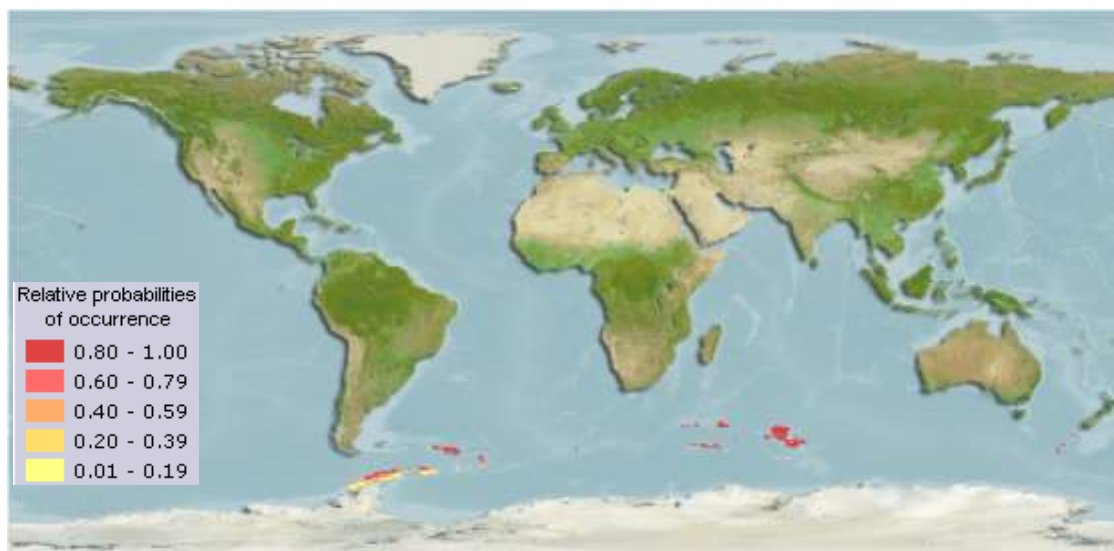
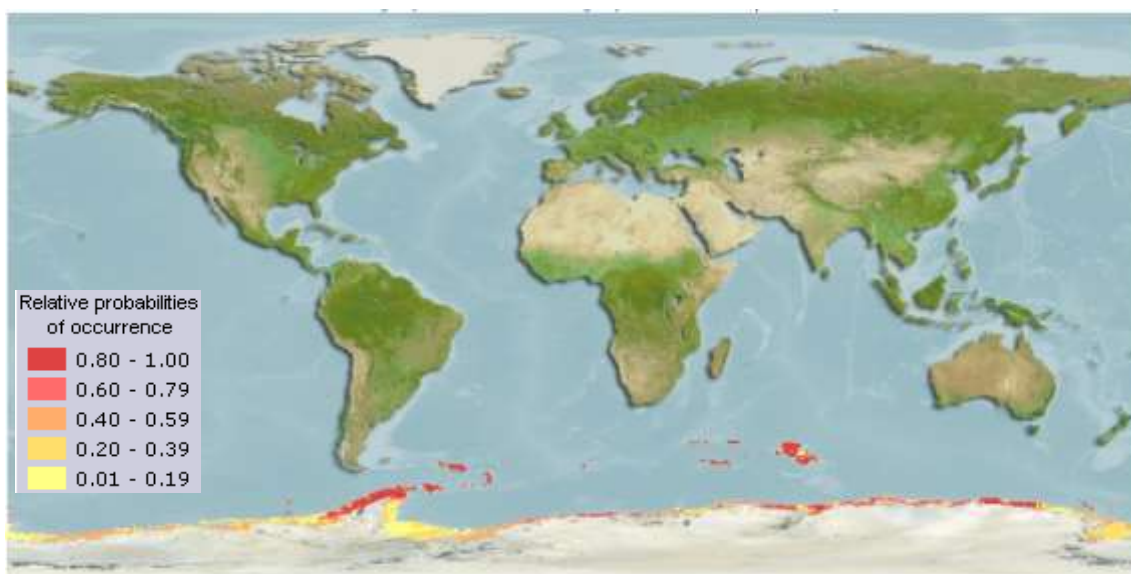
sazonalidade na produção primária (CLARKE; JOHNSTON, 1996; MINTENBECK et al., 2012). O grupo dominante de peixes antárticos pertence à subordem Notothenioidei, a qual é representada principalmente por 5 famílias (Nototheniidae, Channichthyidae, Artedidraconidae, Bathydraconidae, Harpagiferidae), e, 137 espécies (EASTMAN, 2005; BEERS; JAYASUNDARA, 2015). A família de peixes antárticos Nototheniidae é a dominante no oceano Antártico (conhecido também como oceano Austral) sendo representada por 12 gêneros e 50 espécies, apresentando grande variabilidade em relação ao tamanho, forma corpórea, habitat e distribuição (EASTMAN; EAKIN, 2000; EASTMAN, 2005; BEERS; JAYASUNDARA, 2015). Os Nototheniidae estão largamente distribuídos pelo oceano Antártico ocupando todos os habitats bênticos e de coluna d'água, sendo responsáveis por aproximadamente 91% da biomassa (KOCK, 1992; EASTMAN, 2005).

Dentre as espécies de peixes existentes na Baía do Almirantado, destacam-se *Notothenia rossii* (Richardson, 1844) e *Notothenia coriiceps* (Richardson, 1844) (Figura 2), endêmicas da região antártica (GON; HEEMSTRA, 1990). *N. rossii* está presente no extremo norte da Península Antártica, em latitudes menores (nas ilhas: Arco Scotia, Ilhas Príncipe Edward, Crozet, Kerguelen, Heard e Macquarie) (HUREAU, 1966; CARDOSO, 2005; FISHBASE, 2017) (Figura 3). *N. coriiceps* é dominante na região costeira do continente antártico, incluindo as Ilhas Shetlands do Sul, Arquipélago de Palmer e Ilhas Órcades do Sul, habitando profundidades de até 450 metros nas águas da Península Antártica (DEWITT, 1971; GON; HEEMSTRA, 1990; FISHBASE, 2017) (Figura 4).

FIGURA 2 - *Notothenia rossii* E *Notothenia coriiceps*



LEGENDA: A) *Notothenia rossii* FONTE: BARNES (2006)  
B) *Notothenia coriiceps* FONTE: RAUSCHERT (1986)

FIGURA 3 - DISTRIBUIÇÃO DE *Notothenia rossii*FONTE: [http://www.aquamaps.org/receive.php?type\\_of\\_map=regular#](http://www.aquamaps.org/receive.php?type_of_map=regular#)FIGURA 4 - DISTRIBUIÇÃO DE *Notothenia coriiceps*FONTE: [http://www.aquamaps.org/receive.php?type\\_of\\_map=regular#](http://www.aquamaps.org/receive.php?type_of_map=regular#)

As regiões antárticas apresentam sazonalidade luminosa marcante, sendo que, durante os meses de verão, quando a temperatura do ar se eleva acima do ponto de congelamento, ocorre fluxo d'água de derretimento das geleiras e da neve sazonal nas áreas costeiras. Isso é mais importante nas regiões situadas na periferia do continente, ou seja, na Península Antártica e nas ilhas Shetlands do Sul, onde as temperaturas de verão são mais altas e o derretimento expõe o solo ou a rocha (FOSTER, 1984). A sazonalidade luminosa encontrada no ecossistema antártico limita a quantidade de biomassa e a

produtividade primária do oceano (EASTMAN, 1993; BARGELLONI; MARCATO; PATARNELLO, 1998). Por isso, *N. rossii* e *N. coriiceps* apresentam como estratégia ecológica baixo ritmo de crescimento (LA MESA; VACCHI, 2001), onde é maximizada a aquisição de alimentos e minimizado o custo energético para sobreviver (LAWS, 1984; BARRERA-ORO; WINTER, 2008). Durante o verão há maior acúmulo de alimentos e consequente armazenagem de lipídios; fonte de energia que estará disponível durante períodos de escassez alimentar (por ex.: no inverno) (CLARKE, 1988; PÖRTNER; MARK; BOCK, 2004). O baixo ritmo de crescimento e a vida longa são características da maioria dos peixes antárticos. Como consequência atingem a maturidade sexual com idade avançada, ao redor dos 5 anos (KOCK, 1992). A época de desova é geralmente de duração limitada apresentando baixa fecundidade (DUHAMEL et al., 1993) quando comparados com espécies de ambientes tropicais e temperados. Os nototenídeos apresentam papel central na cadeia trófica antártica, apresentando dieta diversificada, incluindo algas, gastrópodes e pequenos isópodes (BARRERA-ORO; WINTER, 2008; RAGA et al., 2015) e, são predados por animais topo de cadeia, como cefalópodes, aves, focas e baleias (HUREAU, 1994; LA MESA; EASTMAN; LICANDRO, 2006). Portanto, são um importante elo entre os pequenos invertebrados e os altos predadores do ecossistema marinho antártico.

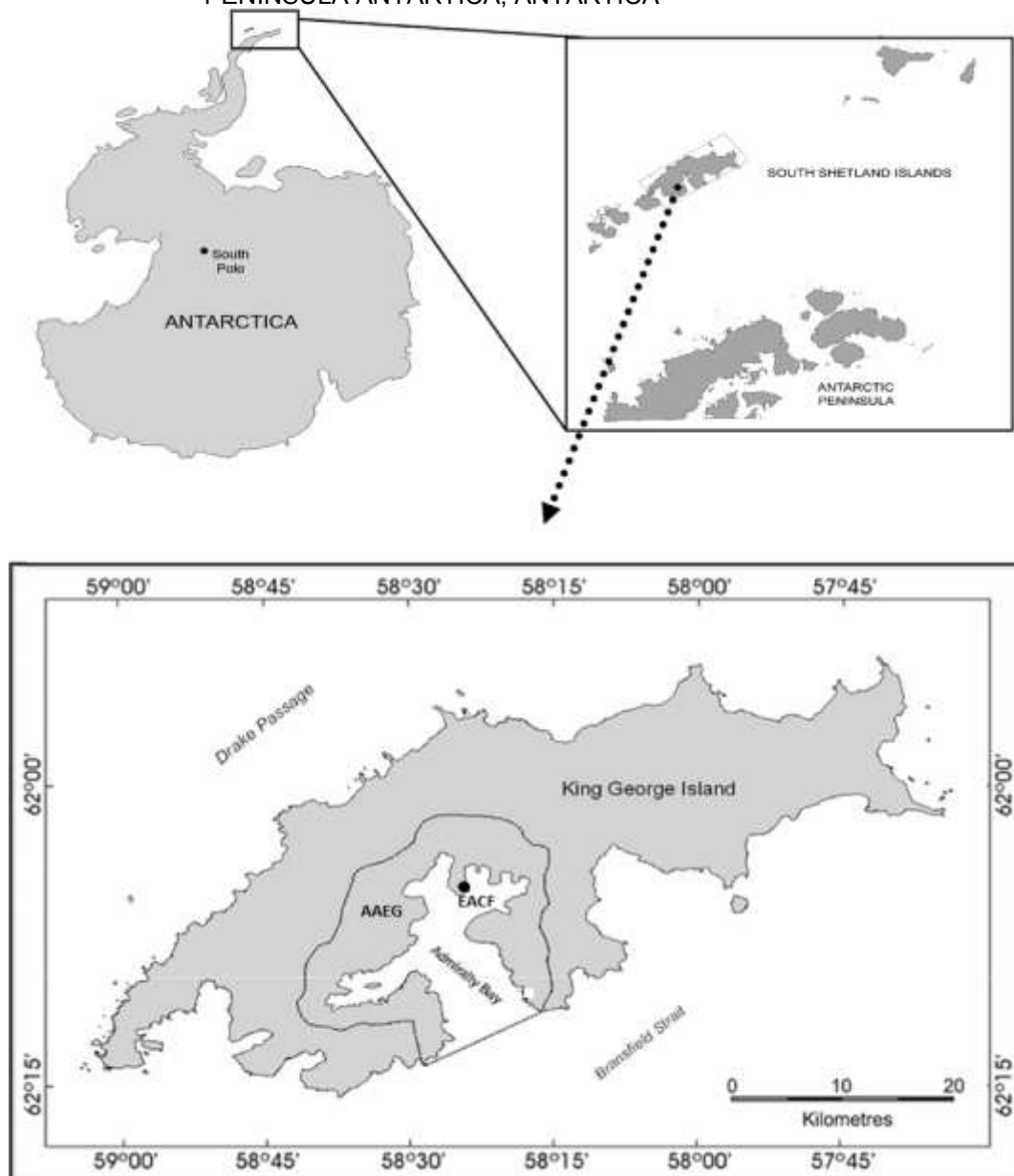
## 1.2 TEMPERATURAS ELEVADAS E OS IMPACTOS FISIOLÓGICOS EM PEIXES ANTÁRTICOS

Desde meados do século XVIII, com o início da revolução industrial, houve um aumento das temperaturas médias globais das águas superficiais oceânicas de aproximadamente 0,7°C (IPCC, 2014). Vale destacar que, este aquecimento ocorreu em especial nas águas superficiais da Península Antártica, onde localiza-se a Estação Antártica Brasileira Comandante Ferraz (EACF) (Figura 5), registrando-se um aumento de aproximadamente 2°C desde a segunda metade do século XX (MEREDITH; KING, 2005; CLARKE et al., 2007; TURNER et al., 2014). Projeções climáticas indicam que até o fim do século XXI haverá o aumento de mais 2°C em algumas regiões costeiras do oceano Antártico (IPCC, 2014), o que vem suscitando questionamentos a respeito das consequências da



elevação térmica, da alteração das correntes de água e da extensão do gelo no mar sobre a produtividade primária, bem como os reflexos na cadeia alimentar do ecossistema antártico e na ecofisiologia dos organismos que vivem na região (CLARKE et al., 2007; TURNER et al., 2014; MINTENBECK et al., 2012; WERNBERG; STRAUB, 2016).

FIGURA 5 - LOCAL DE ESTUDO: BAÍA DO ALMIRANTADO, ILHA REI GEORGE, PENÍNSULA ANTÁRTICA, ANTÁRTICA



LEGENDA: Área Antártica Especialmente Gerenciada (AAEG). EACF: Estação Antártica Comandante Ferraz. FONTE: Adaptado de MONTONE et al. (2016).

A singularidade da ictiofauna antártica é o resultado da longa história evolutiva da radiação adaptativa em um ambiente isolado e com temperaturas

sub-zero. Além disso, devido à ausência de competição com outros grupos de peixes, houve a diversificação morfológica e ecológica permitindo a ocupação de diversos nichos (EASTMAN; MCCUNE, 2000). Adaptações fisiológicas para a sobrevivência em um ambiente com temperaturas baixas, alta solubilidade de oxigênio na água e altos níveis de radiação ultravioleta foram necessárias (PÖRTNER; KNUST, 2007). Assim, os peixes ali viventes apresentam adaptações como o aumento da densidade mitocondrial (GUDERLEY, 2004; URSCHER; O'BRIEN, 2009), a alta eficiência catalítica enzimática (SOMERO, 2010), a *up*-regulação de genes envolvidos na ação de antioxidantes (CHEN et al., 2008), a grande concentração de ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) e poliinsaturados (PUFA) (BRODTE et al., 2008; CROCKETT, 2011), as glicoproteínas anticongelantes (AFGPs) (CHENG; DEVRIES, 1991) e a baixa viscosidade sanguínea (DI PRISCO et al., 2002). *N. rossii* e *N. coriiceps* apresentam rins aglomerulares, onde a urina é produzida pela secreção tubular e não pela filtração. Com isso, moléculas de baixo peso molecular, como AFGPs não são eliminadas, ou seja, há a conservação de moléculas de baixo peso molecular que são essenciais para a sobrevivência em temperaturas tão baixas (EASTMAN, 1993; VERDE et al., 2011). Sem contar que, uma redução da quantidade de íons e moléculas filtradas do plasma pelo glomérulo renal, significa que há redução do custo energético envolvido na reabsorção e ressíntese de moléculas (EASTMAN, 1993).

O alto grau de estenotermia apresentado no ecossistema marinho Antártico resultou na redução da temperatura crítica máxima (CT<sub>max</sub><sup>2</sup>) dos organismos antárticos (PECK, 2002; PÖRTNER; PECK; SOMERO, 2007), e dessa forma, a ictiofauna é considerada vulnerável aos efeitos de alterações climáticas. Somero e DeVries (1967) realizaram o primeiro estudo a fim de determinar a faixa de tolerância térmica de três representantes da família Nototheniidae: *Trematomus bernacchii*, *Pagothenia borchgrevinki* e *Trematomus hansonii* constatando que esta é próxima de 5-6°C. Contudo, estudos indicam que algumas espécies de peixes antárticos apresentam melhores respostas metabólicas que outras frente a situações adversas (como a elevação térmica) (PECK, 2002; SEEBACHER et al., 2005). Trabalhos recentes têm relatado maior

---

<sup>2</sup> CT<sub>max</sub> é definida como a temperatura em que os movimentos do indivíduo tornam-se desorganizados e há a perda da homeostase culminando na morte (Cowles; Bogert, 1944).

plasticidade térmica da ictiofauna Antártica quando aclimatados previamente em temperaturas superiores a 0°C (LANNIG; STORCH; PÖRTNER, 2005; PODRABSKY; SOMERO, 2006; BILYK; DE VRIES, 2011; BILYK; EVANS; DEVRIES, 2012; STROBEL et al., 2012; STROBEL et al., 2013). Já que quando aclimatados em diferentes temperaturas apresentam mecanismos de regulação que normalmente modificam a resistência térmica (SOMERO, 2004). Assim, a resposta ao agente estressor é dependente da temperatura e do tempo de exposição (PECK; WEBB; BAILEY, 2004; BEERS; SIDELL, 2011). Podrabsky e Somero (2006) observaram que após aclimação a 4°C *T. bernacchii* e *Trematomus pennellii* foram capazes de aumentar sua tolerância térmica, sobrevivendo por maior período de tempo na CTmax de 14°C quando comparado aos espécimes mantidos à -1,8°C. Experimentos semelhantes foram realizados com outras espécies antárticas, incluindo *N. coriiceps* que ao serem aclimatadas a 4°C demonstraram um aumento significativo da CTmax ( $17,39 \pm 1,20^{\circ}\text{C}$ ) em relação a CTmax ( $16,17 \pm 1,40^{\circ}\text{C}$ ) aferida em animais mantidos previamente em temperatura próxima à ambiental (BILYK; DE VRIES, 2011; BILYK; EVANS; DEVRIES, 2012). Além da variação entre as espécies e os estágios de vida (PÖRTNER; FARREL, 2008; CLARK; SANDBLOM; JUTFELT, 2013), a distribuição biogeográfica também influencia nos limites de tolerância térmica como demonstrado no trabalho de Bilyk e De Vries (2011). Peixes antárticos encontrados em regiões de alta latitude, onde as temperaturas baixas são constantes apresentam menores CTmax em relação aos que habitam as regiões com variações da cobertura de gelo (BILYK; DE VRIES, 2011), como a Península Antártica.

Na literatura há trabalhos que investigam os efeitos da elevação térmica em peixes antárticos em relação aos ajustes compensatórios respiratórios (ROBINSON; DAVISON, 2008; SANDERSFELD; MARK; KNUST, 2017), cardiovasculares (SEEBACHER et al., 2005; FRANKLIN; DAVISON; SEEBACHER, 2007; EGGINTON; CAMPBELL, 2016), da viscosidade sanguínea (DI PRISCO et al., 1991; EGGINTON, 1996; BUCKLEY; HEDRIK; HILLMAN, 2014), enzimáticos (LANNIG; STORCH; PÖRTNER, 2005; SEEBACHER et al., 2005; JAYASUNDARA; HEALY; SOMERO, 2013; STROBEL et al., 2012, 2013; ENZOR; PLACE, 2014; MACHADO et al., 2014; CARNEY ALMROTH et al., 2015; FORGATI et al., 2017; KLEIN et al., 2017a,

SOUZA et al., 2018), de metabólitos intermediários (LOWE; DAVISON, 2005; BRODTE; KNUST; PÖRTNER, 2006; SANDERSFELD; MARK; KNUST, 2017) entre outros. Os estudos sobre os níveis organizacionais mais baixos, como moléculas ou enzimas, são importantes para compreender os mecanismos fisiológicos envolvidos na resposta térmica sistêmica, a fim de elucidar como os processos de crescimento e de reprodução podem vir a ser afetados e o consequente impacto no ecossistema. Isto é, as limitações de desempenho podem tornar-se evidentes no nível organizacional mais complexo, sendo que a especialização de moléculas pode forçar uma interdependência dos limites de tolerância térmica nos diferentes níveis organizacionais (PÖRTNER; PECK; SOMERO, 2007). Strobel et al. (2013) investigaram a atividade de enzimas mitocondriais, como a citrato sintase e a citocromo C oxidase, e demonstraram que *N. rossii* é capaz de modular de forma limitada o metabolismo energético sob condições de aumento de térmico (7°C) e de PCO<sub>2</sub>, o que pode restringir a aclimação em condições ambientais adversas.

Frente aos fatos ocorridos, é importante compreender os mecanismos fisiológicos e a plasticidade metabólica dos peixes antárticos, visando à obtenção de dados científicos para a elaboração de planos de gerenciamento da Baía do Almirantado, que é classificada como Área Antártica Especialmente Gerenciada (AAEG), significando que todos os países ali instalados, devem administrar a região, por meio de um plano de manejo apropriado, a fim de evitar impactos cumulativos (CAMPOS, 2007; SICIŃSKI, et al., 2011; ATCM XXXVII, 2014). Dessa forma, esta tese foi desenvolvida com o objetivo de avaliar os efeitos fisiológicos da elevação térmica (8°C) a longo prazo (90 dias) em *N. rossii* (capítulo I: “Efeitos do estresse térmico a longo prazo no nototenídeos antártico *Notothenia rossii*”) e a curto prazo (2 a 144h) em *N. rossii* e *N. coriiceps* no tecido renal (capítulo II: “Avaliação dos efeitos do estresse térmico agudo no tecido renal dos nototenídeos antárticos *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps* através de biomarcadores fisiológicos e bioquímicos”) e no plasma (capítulo III: “O efeito do estresse térmico de curto prazo no perfil bioquímico plasmático de nototenídeos antárticos”).

## CAPÍTULO I

### Efeitos do estresse térmico a longo prazo no nototenídeo antártico *Notothenia rossii*

#### RESUMO

A estabilidade térmica do oceano Antártico levanta questionamentos sobre a plasticidade metabólica dos nototenídeos antárticos frente às alterações de temperatura, como as observadas na Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Península Antártica. Neste estudo, os peixes *Notothenia rossii* sobreviveram 90 dias à temperatura de 8°C e tiveram o fator de condição mantido. Entretanto, o índice hepatossomático reduziu (0.29x), demonstrando que houve diminuição do acúmulo de nutrientes (lipídios), em vista da alteração das demandas energéticas para sustentar a sobrevivência. As concentrações plasmáticas de cálcio, magnésio, colesterol e globulinas reduziram, enquanto as de glicose (1.91x) e albumina (1.26x) aumentaram em decorrência da elevação térmica. Houve alteração do principal substrato energético armazenado, sendo que o acúmulo de glicogênio possivelmente promove maior resistência ao calor. Os animais aclimatados a 8°C apresentaram aumento marcante na atividade da lactato desidrogenase (exceto as brânquias), demonstrando o aumento do metabolismo anaeróbico. Além disso, o aumento da atividade da malato desidrogenase sugere que os peixes aclimatados a 8°C elevaram o potencial gliconeogênico em todos os tecidos analisados. O aumento da demanda aeróbica foi constatado no fígado através da mensuração da atividade da citrato sintase (2.23x). A redução da atividade da superóxido dismutase, catalase, e glutathione-S-transferase indicam que possivelmente os níveis observados são suficientes na condição de 8°C, estabelecendo uma nova faixa de ação fisiológica para a defesa antioxidante. Nossos dados sugerem que *N. rossii* possui alguns mecanismos compensatórios que permitem a sobrevivência na temperatura de 8°C por 90 dias.

Palavras-chave: Peixe antártico. Elevação térmica. Alterações metabólicas. Metabolismo energético. Defesa antioxidante. Índices biológicos.

Artigo referente ao presente capítulo:

Kandalski, P.K.; Zaleski, T.; Forgati, M.; Baduy, F.; Eugênio D. S.; Machado, C.; De Souza, M. R. D. P.; Piechnik, C. A.; Donatti, L. Effect of long-term thermal stress on Antarctic nototheniid *Notothenia rossii*. Submetido para publicação na revista **Fish Physiology and Biochemistry** em 23 de janeiro de 2018.

## 1 INTRODUÇÃO

A ictiofauna do oceano Antártico é dominada por perciformes da subordem Notothenioidei, os quais são altamente endêmicos e possuem especializações que permitem sua sobrevivência em uma estreita faixa de temperatura e alta disponibilidade de oxigênio. Dessa forma, elevações na temperatura da água, podem afetá-los principalmente devido à baixa taxa metabólica (PÖRTNER, 2006) e a limitada capacidade de aclimação das espécies estenotérmicas quando comparadas com as euritérmicas (CLARKE, 1991; PECK, 2002). O aquecimento observado no ar atmosférico (próximo a 3°C) e nas águas superficiais (mais de 1°C) em torno da Península Antártica ao longo dos últimos 60 anos (MEREDITH; KING, 2005; TURNER et al., 2009; QIU, 2012) é particularmente preocupante em águas tão estáveis termicamente. Projeções climáticas indicam que haverá o aumento de 2°C em algumas regiões costeiras do oceano Antártico até o fim do século XXI (IPCC, 2014), afetando a dinâmica e a distribuição de peixes a longo prazo (BOOTH; BOND; MACREADIE, 2011; MINTENBECK et al., 2012). Além disso, o aquecimento das águas pode impactar na biologia e ecologia das relações presas e predadores e, conseqüentemente, na cadeia trófica local (MINTENBECK et al., 2012).

Até o momento, apenas alguns estudos demonstraram o efeito do estresse térmico a longo prazo (mais de dois meses) em peixes antárticos (LANNIG; STORCH; PÖRTNER, 2005; ROBINSON; DAVISON, 2008; WINDISCH et al., 2014). Em *Notothenia rossii* Richardson, 1844 Strobel et al. (2012) relataram aclimação parcial da taxa metabólica com alterações da capacidade mitocondrial que podem estar relacionadas com a demanda de energia elevada para a regulação ácido-base após 29-36 dias a 7°C.

A resposta ao estresse pode ser avaliada através de parâmetros que demonstram o desempenho individual dos animais, bem como através de marcadores do metabolismo energético que permitem inferir a demanda de energia nos tecidos diante do estresse (WENDELAAR, 1997; BARTON, 2002; THORNE et al., 2010). A manutenção do suprimento energético é suportada pelo consumo de reservas de energia levando a alterações na glicose plasmática (MARTINS; SCHRAMA; VERRETH, 2006), assim como do conteúdo de lipídios e carboidratos nos tecidos (LOWE; DAVISON, 2005; BRODTE et al., 2008).

Assim, avaliou-se neste trabalho, o impacto da temperatura na capacidade de oxidação aeróbica e anaeróbia através da mensuração dos substratos energéticos e das atividades das enzimas citrato sintase (CS) e malato desidrogenase (MDH), as quais são responsáveis por catalisar as etapas inicial e final do ciclo do ácido cítrico, respectivamente. Além disso, a MDH juntamente com a mensuração da atividade da glicose-6-fosfatase (G6Pase) são utilizadas como indicadores da gliconeogênese, e a lactato desidrogenase (LDH) serve como marcador do metabolismo anaeróbico (NELSON; COX, 2002).

Em exposições prolongadas a um agente estressor, como a temperatura, as reservas energéticas do organismo podem estar reduzidas (BRODTE; KNUST; PÖRTNER, 2006; WINDISCH et al., 2011) tendo em vista que o estresse a longo prazo acarreta a uma perda contínua da homeostase, sendo que a adaptação pode não ocorrer ou então ocorrer depois de um longo período de tempo (SCHRECK, 1981). O aumento térmico pode levar a mudanças nos substratos energéticos havendo a formação de estoques de glicogênio, e dessa forma, o metabolismo energético dos peixes adaptados ao frio que apresentam acúmulo de lipídios a fim de facilitar o transporte intracelular de oxigênio (PÖRTNER; LUCASSEN; STORCH, 2005), torna-se dependente de carboidratos (BRODTE; KNUST; PÖRTNER, 2006; WINDISCH, 2011; JAYASUNDARA; HEALY; SOMERO, 2013). Quando as respostas ao estresse não ocorrem de forma satisfatória observa-se uma redução da resistência, comprometimento da reprodução e limitação do crescimento (BARTON, 2002; VAN DE NIEUGIESSEN et al., 2008) podendo alterar os índices de bem-estar dos peixes (LLORET et al., 2002). Com a elevação da temperatura há uma maior atividade do metabolismo, havendo um maior consumo de oxigênio (HOCHACHKA; SOMERO, 2002), refletindo um aumento da demanda mitocondrial e a uma progressiva hipóxia nos fluidos corpóreos ocasionando o aumento do estresse oxidativo (ABELE et al., 2001; JAYASUNDARA; HEALY; SOMERO, 2013).

Nototenídeos apresentam altos níveis constitutivos de enzimas antioxidantes (JOHNSTON et al., 1998; ABELE; PUNTARULO, 2004), provavelmente devido às adaptações ao ambiente frio, como por exemplo, altas densidades mitocondriais e altos níveis de ácidos graxos insaturados nas membranas biológicas (JOHNSTON et al., 1998; VERDE; PARISI; DI PRISCO,

2006). O estresse térmico é conhecido por aumentar o consumo de oxigênio e, consequentemente, a produção de espécies reativas ao oxigênio (EROs) (MUELLER et al., 2011). A fim de lidar com a oxidação celular devido a ação das EROs, as células sintetizam enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, o qual será decomposto pela catalase (CAT) em água e oxigênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). A glutathione-S-transferase (GST) é uma enzima GSH-dependente que catalisa a biotransformação de compostos endógenos e exógenos a fim de que estes se tornem solúveis em água (LUSHCHAK; BAGNYUKOVA, 2006a, b; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Frente ao estresse térmico as atividades das enzimas antioxidantes tendem a ser moduladas estabelecendo uma nova faixa de ação a fim de contrabalancear os efeitos das EROs (LUSHCHAK; BAGNYUKOVA, 2006b).

Estudos que avaliam o estresse térmico agudo podem subestimar a capacidade de adaptação de espécies estenotérmicas em altas temperaturas (ENZOR; PLACE, 2014; FORGATI et al., 2017; KLEIN et al., 2017A; SOUZA et al., 2018) já que mudanças transitórias nas atividades de enzimas do metabolismo energético e da defesa antioxidante auxiliam na prevenção das consequências do estresse e na restauração da homeostase. Além disso, as respostas fisiológicas de espécies adaptadas ao frio são relativamente lentas, e as alterações funcionais a nível celular podem ser mínimas ou ausentes durante a aclimação a curto prazo (BILYK; EVANS; DEVRIES, 2012; MACHADO et al., 2014; MUELLER et al., 2014).

Os nototenídeos apresentam características bioquímicas e fisiológicas que permitem a sua tolerância a temperaturas extremamente frias e estáveis. Estudos prévios demonstram que os nototenídeos apresentam uma limitada capacidade de tolerância térmica máxima, ou seja, muitas espécies não toleram variações mínimas na temperatura do ambiente (SOMERO; DEVRIES, 1967; PODRABSKY; SOMERO, 2006). Entretanto, algumas espécies de peixes antárticos, como a *Pagothenia borchgrevinkii*, não perderam a capacidade de responder ao desafio térmico (SEEBACHER et al., 2005; ROBINSON; DAVISON, 2008). Outros estudos ainda indicam que *N. rossii* é capaz de sobreviver por um determinado período de tempo em temperaturas elevadas, com valores críticos entre 7 e 8°C (MARK et al., 2012; STROBEL et al., 2012;



STROBEL; PÖRTNER; MARK, 2013b; MACHADO et al., 2014; FORGATI et al., 2017; SOUZA et al., 2018). O custo metabólico basal em temperatura elevadas é alto, e há o comprometimento da capacidade mitocondrial o que pode limitar o escopo aeróbico de *N. rossii* (MARK et al., 2012; STROBEL et al., 2012). Por isso, questiona-se se *N. rossii*, espécie endêmica antártica, é capaz de suprir os novos requisitos energéticos frente à elevação térmica a longo prazo. Para tal fim, investigou-se as respostas fisiológicas de *N. rossii* utilizando-se parâmetros bioquímicos no plasma e nos tecidos branquial, cardíaco, hepático, muscular e renal, além de índices biológicos dos animais submetidos a aclimação a 8°C por 90 dias.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Avaliar as respostas fisiológicas do peixe antártico *Notothenia rossii* submetido à temperatura de 8°C por 90 dias.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Determinar os índices biológicos, fator de condição (K) e índice hepatossomático (HSI), de *N. rossii* submetido à temperatura de 8°C por 90 dias.
- Determinar a concentração dos substratos energéticos (glicogênio, lipídios totais e proteínas totais) no fígado e músculo de *N. rossii* submetido à temperatura de 8°C por 90 dias.
- Determinar a concentração dos constituintes plasmáticos (glicose, colesterol total, triglicerídeos, proteínas totais, albumina, globulinas, magnésio e cálcio) de *N. rossii* submetido à temperatura de 8°C por 90 dias.
- Avaliar as variações na atividade de enzimas relacionadas ao metabolismo energético, através de análises da atividade da malato desidrogenase (MDH) e da lactato desidrogenase (LDH) das brânquias, coração, fígado, músculo e rim; da citrato sintase (CS) das brânquias, coração, fígado e rim; e, da glicose-6-fosfatase (G6Pase) do fígado e rim de *N. rossii* submetido à temperatura de 8°C por 90 dias.
- Avaliar as variações na atividade de enzimas relacionadas a defesa antioxidante, através de análises da atividade da catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST) das brânquias, coração e rim; e da superóxido dismutase (SOD) brânquias, coração, fígado, músculo e rim de *N. rossii* submetido à temperatura de 8°C por 90 dias.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 DECLARAÇÃO DE ÉTICA

O trabalho foi executado de acordo com a ética e regras das leis brasileiras e do Tratado Antártico. O Ministério do Meio Ambiente concedeu a licença ambiental e o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Paraná (CEUA - UFPR) sob o nº 496/2010.

#### 3.2 COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS E ARRANJO EXPERIMENTAL

Os exemplares de *N. rossii* ( $n = 19$ , comprimento total =  $33,11 \pm 1,41$  cm (média  $\pm$  desvio padrão) e peso =  $418 \pm 53,30$  g) foram capturados com linha e anzol em dois pontos da Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Península Antártica: Punta Plaza ( $62^{\circ}05'64,5''$  S;  $58^{\circ}24'31,7''$  W) e Glaciar Ecology ( $62^{\circ}10'65''$  S;  $58^{\circ}26'5''$  W) a uma profundidade entre 10 a 25 metros. Os animais foram considerados juvenis por apresentarem comprimento total menor que 44 cm (BURCHETT, 1983) e tem entre 4 e 6 anos de idade de acordo com classificação proposta por Linkowski; Zukowski (1980).

Os peixes capturados foram transportados para a Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF), acondicionados durante 5 dias sob condições controladas de temperatura ( $0^{\circ}\text{C} \pm 0.5$ ), salinidade ( $35\text{psu} \pm 1.0$ ), fotoperíodo (12 horas luz/ 12 horas escuro) e aeração constante. Após esse período foram selecionados aleatoriamente e diretamente transferidos para tanques de 1000 litros com temperatura a  $0^{\circ}\text{C} \pm 0.5$  ( $n = 10$ ; 5/ tanque) ou  $8^{\circ}\text{C} \pm 0.5$  ( $n = 9$ / 4-5/ tanque) por 90 dias. A temperatura de  $0^{\circ}\text{C}$  foi escolhida como controle, pois está dentro da temperatura média da região e a de  $8^{\circ}\text{C}$  por ser uma condição próxima ao limite máximo tolerado por *N. rossii* (BILYK; DEVRIES, 2011; MARK et al., 2012; MARK et al., 2012; STROBEL et al., 2012; STROBEL; PÖRTNER; MARK, 2013b). A temperatura da água foi controlada por termostatos Aquaterm 08 (Full Cauge). A cada 48 horas, 50% da água foi renovada, com temperatura controlada de  $0^{\circ}\text{C}$  ou  $8^{\circ}\text{C}$  de acordo com o experimento (0 ou  $8^{\circ}\text{C}$ ). A cada dois

dias (alternando-se a troca de água dos tanques), os peixes foram individualmente alimentados com músculo epaxial de *Notothenia coriiceps*.

Ao fim dos experimentos, após a retirada de sangue da veia caudal, os peixes foram anestesiados com benzocaína 1% (p.v<sup>-1</sup>), eutanasiados por secção medular e imediatamente dissecados. O plasma foi obtido após a centrifugação do sangue a 2000 g por 10 min. Amostras de brânquias, coração, fígado, músculo e rim (médio e posterior) foram obtidas e armazenadas em microtubos de 2 ml e congeladas em freezer à -30°C.

### 3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

#### 3.3.1 Determinação dos índices biológicos

O K e o HSI foram determinados de acordo com as equações  $K=Wt/Lt^3$  e  $HSI\% = WH/Wt \times 100$ , onde Wt é o peso total, Lt é o tamanho total do animal e WH é o peso do fígado (VAZZOLER, 1996). Inicialmente os índices foram analisados para sexos separados e testados quanto a diferença significativa entre os gêneros. Como não houve diferença significativa as análises ocorreram para sexos agrupados.

#### 3.3.2 Determinação da concentração de substratos energéticos

A concentração de glicogênio foi determinada através do método de Dubois et al. (1956), modificado por Bidinoto, Moraes e Souza (1997) sendo expressa como mmol de unidades glicosil-glicose/g de tecido. Os lipídios totais foram estimados através do princípio químico da gravimetria, onde o conteúdo de lipídios totais foi extraído dos tecidos através de uma solução de clorofórmio-metanol, seguindo método estabelecido por Folch, Less e Stanley (1957), expressos em mg de lipídios/g de tecido. As proteínas totais foram determinadas utilizando-se o método de Lowry et al. (1951), utilizando a albumina sérica como padrão e expressas em mg de proteína/g de tecido. A determinação da concentração dos substratos energéticos foi realizada no fígado e músculo.

### 3.3.3 Determinação da composição plasmática

Foram utilizados kits reagentes da Gold Analisa Diagnóstica Ltda. para determinação dos constituintes plasmáticos. A glicose plasmática foi mensurada através do método enzimático da glicose oxidase/peroxidase (TRINDER, 1969). O colesterol total foi determinado enzimaticamente na presença de esterases e da colesterol oxidase (ALLAIN et al., 1974). Os triacilgliceróis plasmáticos foram determinados através do método enzimático pelo glicerol-3-fosfato oxidase (BUCOLO; DAVID, 1973). O conteúdo proteico total do plasma foi determinado pelo método de biureto (GORNALL; BARDAWILL; DAVID, 1949). A fração albumínica foi quantificada pelo método do verde de bromocresol (DOUMAS; WATSON; BIGGS, 1971). A fração globulina foi calculada subtraindo-se os valores de albumina dos de proteína total do plasma. O teor do íon magnésio foi determinado através do método colorimétrico do magon sulfonado (SCHALES; SCHALES, 1941) e dos íons cálcio pelo método da cresoltaleína (CALI; BOWERS; YOUNG, 1973).

### 3.3.4 Determinação das atividades enzimáticas

As amostras foram homogeneizadas em tampão Tris-HCl 200 mM, pH 7.4. Os homogenados utilizados para as análises da defesa antioxidante foram centrifugados a 4°C por 20 min a 12000 *g* e para as análises do metabolismo energético as amostras foram sonicadas (15s) e centrifugadas a 14000 *g* por 10 min a 4°C. Os sobrenadantes foram aliquotados e usados para os ensaios das atividades enzimáticas usando o espectrofotômetro de microplacas (EPOCH Microplate Spectrophotometer, BioTek, Winooski, VT, USA). As análises enzimáticas do metabolismo energético e da defesa antioxidante, foram mensuradas em triplicata sob condições ótimas de substrato e cofator em uma temperatura não desnaturante e não fisiológica de 20°C e 25°C, respectivamente (KAWALL et al., 2002; CARNEY ALMROTH et al., 2015).

Os níveis das atividades das enzimas LDH (EC 1.1.1.27), MDH (EC 1.1.1.37), CS (EC 4.1.3.7) e G6Pase (EC 3.1.3.9) foram analisados em todos os tecidos, excetuando-se a CS e G6Pase muscular. A SOD (EC 1.15.1.1) foi avaliada em todos os tecidos, enquanto os níveis de atividade da CAT (EC

1.11.1.6) e da GST (EC 2.5.1.18) foram mensurados nos tecidos branquial, cardíaco e renal.

A concentração de proteínas totais foi mensurada pelo método de Bradford com Coomassie Brilliant Blue G-250 (BRADFORD, 1976) usando albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

Uma unidade de atividade de LDH, MDH, CS, G6Pase e GST é definida como a quantidade de enzima que consome 1  $\mu\text{mol}$  of substrato ou gera 1  $\mu\text{mol}$  de produto por minuto ( $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}$ , mU e  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ , U; respectivamente). Uma unidade de atividade de SOD é definida como a quantidade de enzima (por mg de proteína) que inibe a reação de redução do NBT para azul formazan pela geração de  $\text{O}_2^-$  através da hidroxilamina em solução alcalina pela inibição máxima de 50%. Essa inibição foi medida espectrofotometricamente a 560 nm. Uma unidade de atividade da CAT é definida como a quantidade de enzima que consome 1 mmol de peróxido de hidrogênio por minuto. As atividades são expressas em unidades internacionais (U) por miligrama de proteína ( $\text{mU}\cdot\text{mg}^{-1}$  ou  $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ ).

#### 3.3.4.1 Ensaios para a atividade das enzimas do metabolismo energético

A atividade da LDH foi avaliada com meio de reação contendo 200 mM de tampão Tris-HCl (pH 7.4), 14.1 mM NADH, 10 mM de piruvato de sódio, 2 M KCl e sobrenadante da amostra (THUESEN; MCCULLOUGH; CHILDRESS, 2005); a reação foi acompanhada através do decréscimo da absorbância em 340 nm. A atividade da MDH foi realizada em meio de reação contendo 200 mM de tampão Tris-HCl (pH 7.4), 14.1 mM NADH, 8 mM de oxaloacetato, 100 mM  $\text{MgCl}_2$  e sobrenadante da amostra (CHILDRESS; SOMERO, 1979); a reação foi monitorada através do decréscimo na absorbância em 340 nm. A atividade da CS foi mensurada em meio de reação com 200 mM de tampão Tris-HCl (pH 7.4), 6 mM acetil-CoA, 3 mM 5,5-dithiobis (ácido-2-nitrobenzoico), 10 mM ácido etileno diamino tetraacético (EDTA), 2 M KCl, 8.0 mM oxaloacetato e sobrenadante da amostra (SABOROWSKI; BUCHHOLZ, 2002), e foi acompanhada pelo aumento da absorbância em 412 nm. A atividade da G6Pase foi determinada por método descontínuo (FATHI et al., 2002) em meio de reação composto por 100 mM de tampão Imidazol (pH 7.4), 1,8 mM EDTA, 26,5 mM de glicose-6-fosfato e

sobrenadante da amostra. Ao adicionar-se o reativo verde de malachita (molibdato de amônia, verde de malachita e Tween) a reação é interrompida e o fosfato inorgânico quantificado em 600 nm.

#### 3.3.4.2 Ensaio para a atividade das enzimas da defesa antioxidante

A atividade da SOD foi avaliada com meio de reação contendo 182 mM de tampão de carbonato de sódio (pH 10.2), 1 mM EDTA, 100  $\mu$ M NBT, 36,85 mM de cloreto de hidroxilamina e sobrenadante da amostra (CROUCH; GANDY; KINSEY, 1981), e foi monitorada através do aumento da absorbância em 560 nm. O meio de reação para acompanhar a atividade da CAT contém 50mM tampão de KPi (pH 7.0), 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (BEUTLER, 1975), a qual foi acompanhada pelo decréscimo da absorbância em 240 nm. A atividade da GST foi mensurada com 100 mM de tampão de NaPi (pH 6.5), 1 mM GSH, 1.5 mM 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) (em etanol) e sobrenadante da amostra (KEEN, HABIG; JAKOBY, 1976) e foi monitorada pelo aumento da absorbância em 340 nm.

### 3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

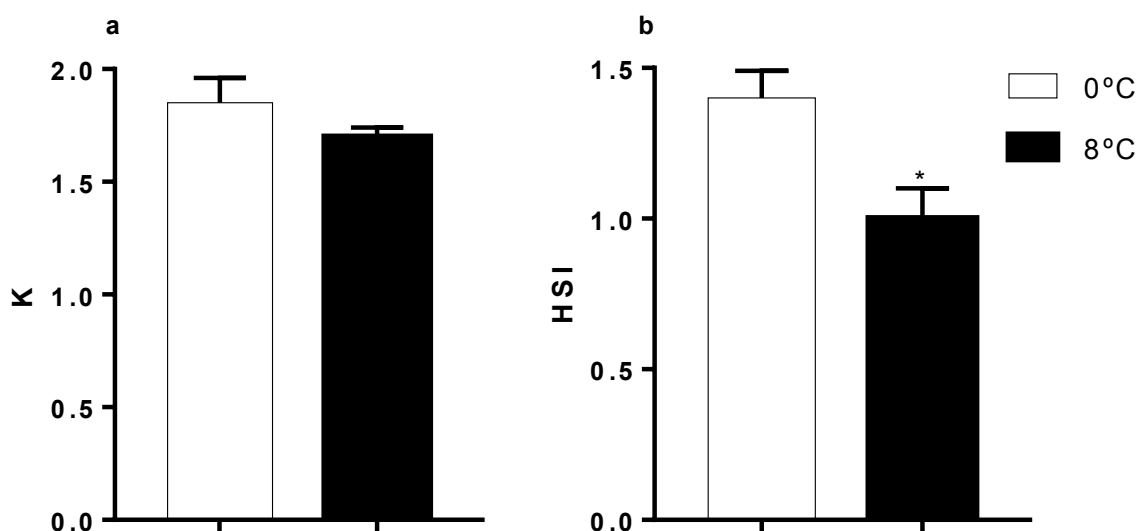
Os dados foram previamente testados para a normalidade (Kolmogorov-Smirnov) e homogeneidade (teste de Levene). As médias foram comparadas através do teste *t* de Student. Os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), e as diferenças foram consideradas significativas se  $p \leq 0.05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 DETERMINAÇÃO DOS ÍNDICES BIOLÓGICOS

Todos os animais sobreviveram durante o período experimental. O valor de K não diferiu entre os animais mantidos em 0°C ( $1.4 \pm 0.09$ , n=10) e 8°C ( $1.70 \pm 0.04$ , n=9,  $t=1.20$ ,  $p=0.25$ ) (Figura 1a). O valor de HSI dos animais mantidos a 8°C ( $1.0 \pm 0.1$ , n=9) foi menor do que o encontrado para os animais mantidos a 0°C ( $1.4 \pm 0.09$ , n=10,  $t=2.55$ ,  $p=0.02$ ) (Figura 1b).

FIGURA 1 - ÍNDICES BIOLÓGICOS DE *Notothernia rossii*



LEGENDA: a) fator de condição e b) HSI = índice hepatossomático de *Notothernia rossii* mantida em 0 (barras brancas) ou 8°C (barras pretas) por 90 dias. Os valores apresentados representam a média  $\pm$  erro padrão da média. Os asteriscos indicam diferença significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre os animais mantidos nas diferentes temperaturas.

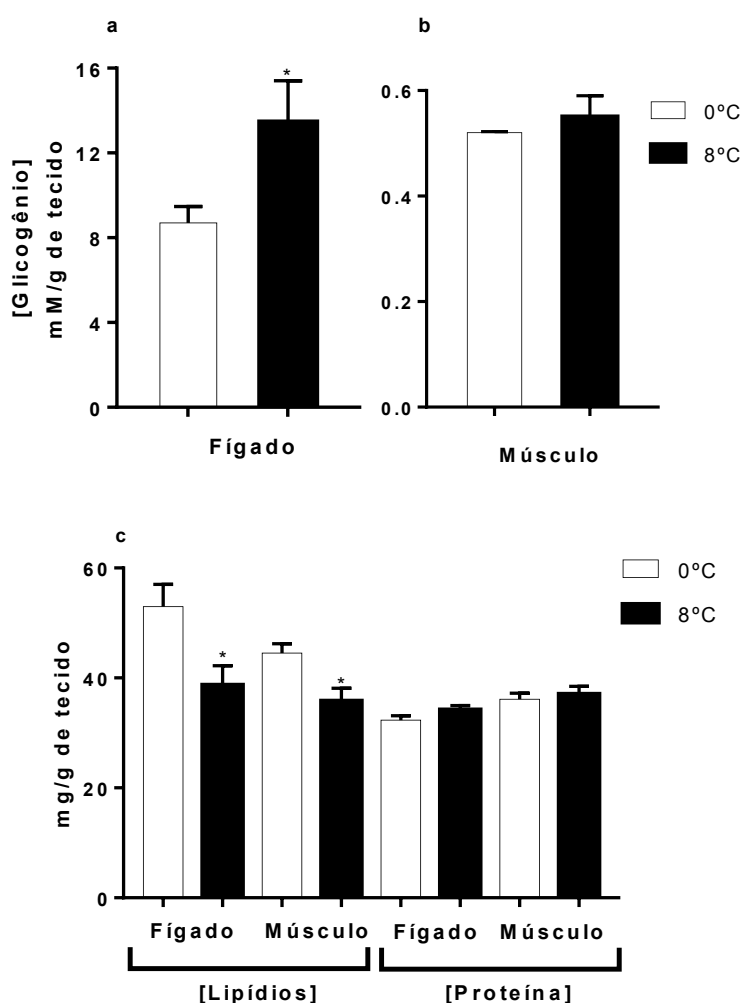
### 4.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATOS ENERGÉTICOS NOS TECIDOS HEPÁTICO E MUSCULAR

A concentração de glicogênio hepático foi maior nos animais mantidos a 8°C ( $t=2.28$ ,  $p=0.04$ ) (Figura 2a), entretanto a concentração de glicogênio muscular não foi alterada em decorrência da elevação térmica ( $t=0.72$ ,  $p=0.49$ ) (Figura 2b). Nos animais mantidos a 0°C encontrou-se uma média de  $8.70 \pm 0.77$  mM/g de glicogênio no tecido hepático e de  $0.52 \pm 0.002$  mM/g no tecido



muscular, enquanto que em 8°C obteve-se uma média de  $13.46 \pm 1.94$  mM/g no fígado e de  $0.55 \pm 0.04$  mM/g no músculo. No fígado e no músculo de *N. rossii*, a concentração de lipídios totais foi menor nos indivíduos mantidos a 8°C ( $38.67 \pm 3.55$ , n=7, e  $35.78 \pm 2.32$  mg.gww<sup>-1</sup>, n=8, respectivamente) em comparação aos animais mantidos a 0°C ( $52.96 \pm 4.05$ , n=10, e  $44.53 \pm 1.68$  mg.gww<sup>-1</sup>, n=8, respectivamente;  $t= 2.51$ ,  $p= 0.02$ ; e  $t= 3.05$ ,  $p= 0.008$ , respectivamente). A concentração de proteínas totais não apresentou variação significativa nos tecidos hepático e muscular entre os animais mantidos a 8°C ( $34.17 \pm 0.81$ , n=9, e  $37.04 \pm 1.44$  mg.gww<sup>-1</sup>, n= 9, respectivamente) em relação aos animais mantidos em 0°C ( $32.32 \pm 0.81$ , n= 10, e  $36.12 \pm 1.11$  mg.gww<sup>-1</sup>, n=9, respectivamente;  $t=1.59$ ,  $p= 0.13$ ; e  $t= 0.51$ ,  $p= 0.62$ , respectivamente) (Figura 2c).

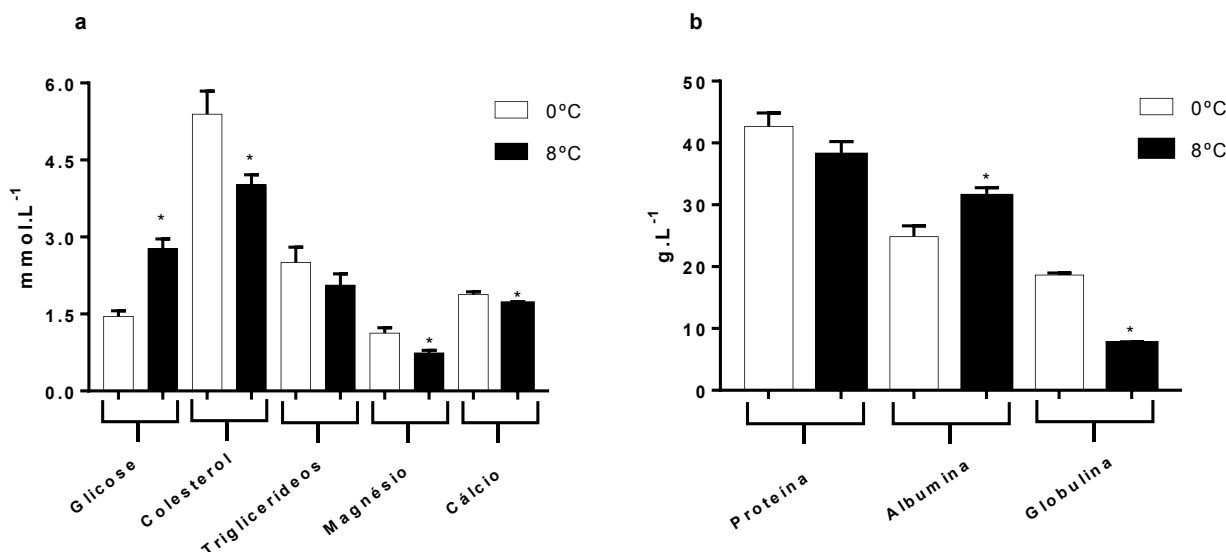
FIGURA 2 – CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATOS ENERGÉTICOS NOS TECIDOS HEPÁTICO E MUSCULAR DE *Notothenia rossii*



LEGENDA: Substratos energéticos de *Notothernia rossii* mantida em 0 (barras brancas) ou 8°C (barras pretas) por 90 dias. Glicogênio hepático (a) e muscular (b); lipídios e proteína hepática e muscular (c). Os valores apresentados representam a média  $\pm$  erro padrão da média. Os asteriscos indicam diferença significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre os animais mantidos nas diferentes temperaturas.

#### 4.3 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO PLASMÁTICA

No plasma de *N. rossii*, verificou-se maiores níveis de glicose plasmática em 8°C ( $2.77 \pm 0.19$  mmol.L<sup>-1</sup>, n=9) em relação aos indivíduos mantidos em 0°C ( $1.45 \pm 0.11$  mmol.L<sup>-1</sup>, n=10;  $t=6.25$ ,  $p<0.01$ ). A concentração de colesterol plasmático foi menor em função do aumento térmico (0°C:  $5.39 \pm 0.45$  mmol.L<sup>-1</sup>, n=10 e 8°C:  $4.02 \pm 0.19$  mmol.L<sup>-1</sup>, n=9;  $t=2.69$ ,  $p=0.02$ ). A concentração de triglicerídeos ( $t=1.17$ ,  $p=0.26$ ) não foi alterada entre os indivíduos mantidos a 8°C ( $2.06 \pm 0.22$  mmol.L<sup>-1</sup>, n=9) e a 0°C ( $2.50 \pm 0.30$  mmol.L<sup>-1</sup>, n=10). Os níveis plasmáticos do magnésio foram menores em 8°C ( $0.74 \pm 0.55$  mmol.L<sup>-1</sup>, n=8) quando comparado com 0°C ( $1.13 \pm 0.10$  mmol.L<sup>-1</sup>, n=10;  $t=3.23$ ,  $p=0.005$ ), os níveis de cálcio apresentaram o mesmo padrão (8°C:  $1.70 \pm 0.04$  mmol.L<sup>-1</sup>, n=8 e 0°C:  $1.88 \pm 0.04$  mmol.L<sup>-1</sup>, n=9;  $t=2.81$ ,  $p=0.01$ ) (Figura 3a). A concentração plasmática de proteína ( $t=1.43$ ,  $p=0.17$ ) não foi afetada pelo aumento térmico ( $38.06 \pm 2.18$  g.L<sup>-1</sup>, n=9) comparado com 0°C ( $42.70 \pm 2.16$  g.L<sup>-1</sup>, n=10). A albumina plasmática foi maior em 8°C ( $31.41 \pm 1.38$  g.L<sup>-1</sup>, n=9) quando comparado com 0°C ( $24.87 \pm 1.74$  g.L<sup>-1</sup>, n=10;  $t=2.89$ ,  $p=0.01$ ), enquanto a fração globulina apresentou menores valores em 8°C ( $7.62 \pm 0.25$  g.L<sup>-1</sup>, n=8) em relação a 0°C ( $18.64 \pm 0.34$  g.L<sup>-1</sup>, n=8;  $t=3.07$ ,  $p=0.007$ ) (Figura 3b).

FIGURA 3 – COMPOSIÇÃO PLASMÁTICA DE *Notothenia rossii*

LEGENDA: a) Glicose, colesterol, triglicerídeos, magnésio e cálcio e em b) concentração proteína, albumina e globulinas em *Notothenia rossii* mantida em 0 (barras brancas) ou 8°C (barras pretas) por 90 dias. Os valores apresentados representam a média  $\pm$  erro padrão da média. Os asteriscos indicam diferença significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre os animais mantidos nas diferentes temperaturas.

#### 4.4 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

Os níveis das atividades das enzimas LDH, CS, MDH, G6Pase, SOD, CAT e GST dos tecidos analisados de *N. rossii* encontram-se nas tabelas 1 e 2.

##### 4.4.1 Atividades das enzimas do metabolismo energético

A atividade da CS foi menor nas brânquias e maior no fígado em reposta ao aumento térmico e não apresentou alterações significativas no coração e no rim. A atividade da MDH foi maior em decorrência do aumento de temperatura em todos os tecidos analisados. A atividade da LDH em *N. rossii* aumentou nos animais mantidos em 8°C nos tecidos cardíaco, hepático, muscular e renal, enquanto que, nas brânquias não apresentou alterações significativas. A atividade da G6Pase não variou frente ao aquecimento (8°C) nos tecidos analisados (Tabela 1).

#### 4.4.2 Atividades das enzimas da defesa antioxidante

Em *N. rossii* mantidos a 8°C, a atividade da SOD foi menor nas brânquias, coração, fígado e músculo e maior no rim. A atividade da CAT foi maior nas brânquias, menor no coração e não apresentou alterações significativas no rim. Após 90 dias a 8°C, a atividade da GST foi menor no coração, e não foi alterada nas brânquias e no rim (Tabela 2).

TABELA 1 – VALORES DA MÉDIA ± ERRO-PADRÃO DA MÉDIA DOS NÍVEIS DE ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO METABOLISMO ENERGÉTICO DE *Nototothenia rossii*

Enzima	T °C	Fígado	t/p	Brânquias	t/p	Músculo	t/p	Coração	t/p	Rim	t/p
<b>CS</b>	0	24.34 ± 2.85 (10)	3.48/0.002*	123.12 ± 25.22 (7)	2.45/0.03*	-		136.99 ± 10.38 (10)	0.27/0.79	89.30 ± 7.32 (10)	0.73/0.47
	8	54.41 ± 8.55 (9)		66.06 ± 7.44 (9)		-		133.52 ± 6.31 (9)		79.33 ± 11.83 (9)	
<b>MDH</b>	0	0.82 ± 0.10 (10)	2.66/0.02*	0.09 ± 0.02 (9)	4.95/<0.01*	0.47 ± 0.06 (7)	2.35/0.03*	1.91 ± 0.14 (9)	7.50/<0.01*	5.30 ± 0.33 (9)	3.11/<0.01*
	8	1.31 ± 0.16 (8)		0.46 ± 0.08 (7)		0.71 ± 0.08 (8)		3.46 ± 0.15 (9)		7.24 ± 0.51 (9)	
<b>LDH</b>	0	0.17 ± 0.03 (8)	2.22/0.04*	1.19 ± 0.28 (7)	0.47/0.64	0.98 ± 0.15 (7)	2.45/0.03*	4.42 ± 0.24 (10)	4.22/<0.01*	0.35 ± 0.02 (8)	2.93/0.01*
	8	0.26 ± 0.02 (6)		1.05 ± 0.17 (9)		1.57 ± 0.18 (9)		6.34 ± 0.40 (9)		0.45 ± 0.02 (6)	
<b>G6Pase</b>	0	35.98 ± 1.57 (10)	0.02/0.99	-		-		-		2.43 ± 0.65 (6)	0.73/ 0.47
	8	35.93 ± 2.45 (9)		-		-		-		2.66 ± 0.50 (6)	

LEGENDA: *Nototothenia rossii* expostos às temperaturas (T) de 0°C (controle) e 8°C (experimentais) por 90 dias. O número de animais utilizado em cada análise está indicado entre parênteses. As atividades da malato desidrogenase (MDH), lactato desidrogenase (LDH) e glicose-6-fosfatase (G6Pase) são expressas em U ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ )/mg de proteína. As atividades da citrato sintase (CS) são expressas em mU ( $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1}$ )/mg de proteína. Os asteriscos (\*) indicam diferença significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre os animais mantidos nas diferentes temperaturas.

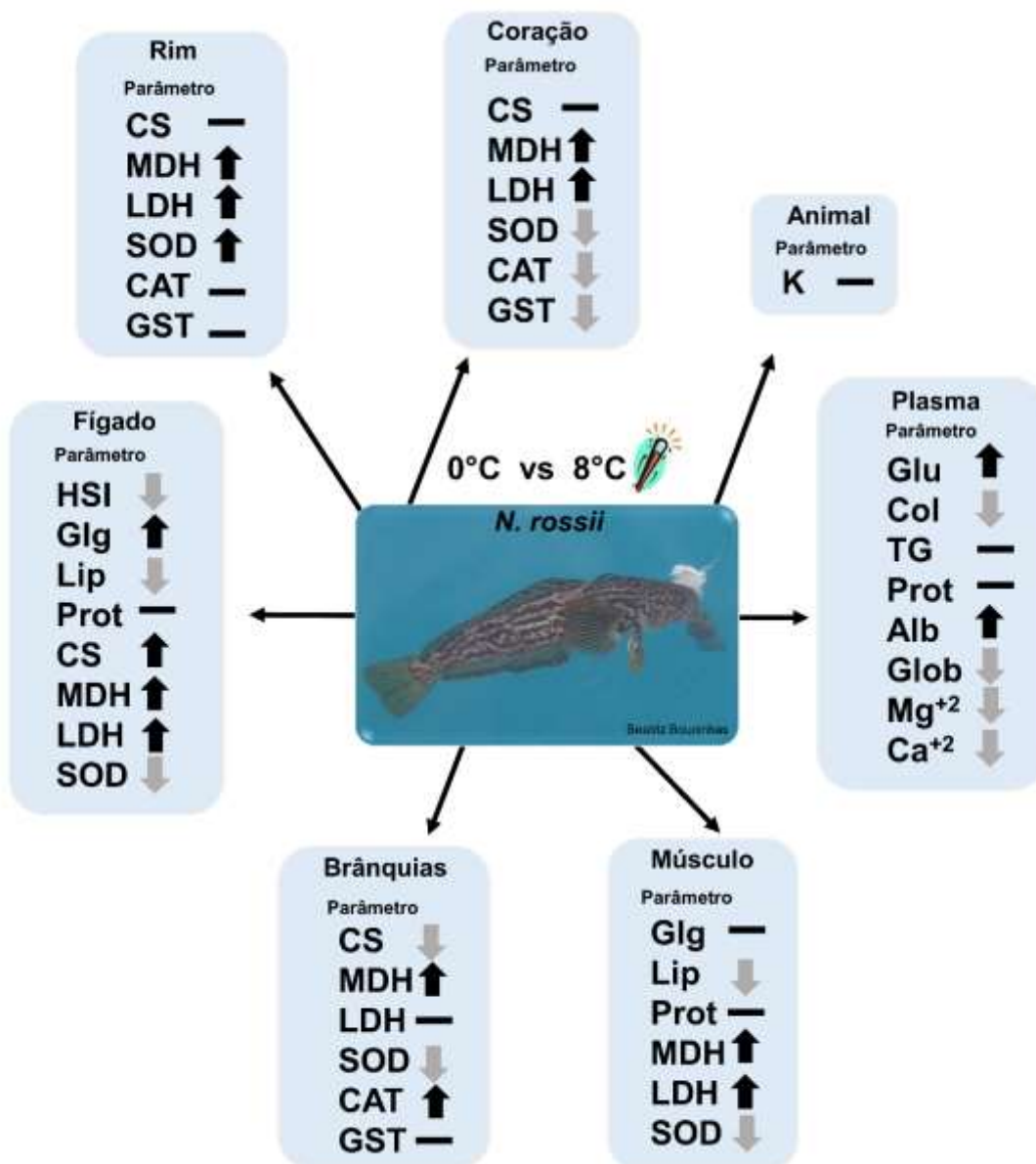
TABELA 2 - VALORES DA MÉDIA ± ERRO-PADRÃO DA MÉDIA DOS NÍVEIS DE ATIVIDADE DAS ENZIMAS DA DEFESA ANTIOXIDANTE DE *Nototothenia rossii*

Enzima	T °C	Fígado	t/p	Brânquias	t/p	Músculo	t/p	Coração	t/p	Rim	t/p
<b>SOD</b>	0	26.82 ± 3.01 (9)	4.95/<0.01*	13.81 ± 0.83 (6)	2.62/0.02*	1.37 ± 0.11 (7)	2.46/0.03*	8.94 ± 1.18 (10)	2.81/0.01*	18.80 ± 2.83 (8)	2.68/0.02*
	8	10.41 ± 0.91 (8)		11.84 ± 0.37 (9)		0.96 ± 0.12 (8)		5.26 ± 0.40 (9)		29.92 ± 3.03 (7)	
<b>CAT</b>	0	-		2.00 ± 0.17 (7)	2.69/0.02*	-		0.033 ± 0.004 (10)	2.68/0.02*	0.07 ± 0.007 (10)	0.05/0.96
	8	-		4.21 ± 0.75 (8)		-		0.020 ± 0.003 (9)		0.07 ± 0.008 (9)	
<b>GST</b>	0	-		0.0055 ± 0.0006 (6)	0.72/0.49	-		0.016 ± 0.0009 (10)	2.71/0.01*	0.18 ± 0.03 (10)	0.12/0.91
	8	-		0.0048 ± 0.0006 (9)		-		0.012 ± 0.0009 (9)		0.18 ± 0.03 (9)	

LEGENDA: *Nototothenia rossii* expostos às temperaturas (T) de 0°C (controle) e 8°C (experimentais) por 90 dias. O número de animais utilizado em cada análise está indicado entre parênteses. As atividades da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST) são expressas em U ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ )/mg de proteína. Os asteriscos (\*) indicam diferença significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre os animais mantidos nas diferentes temperaturas.

O resumo dos resultados obtidos após *N. rossii* ser submetida ao aumento térmico (8°C) por 90 dias é apresentado na figura 4.

FIGURA 4 – ESQUEMA DOS EFEITOS FISIOLÓGICOS OBSERVADOS NO PLASMA E TECIDOS DE *N. ROSSII* SUBMETIDA À TEMPERATURA DE 8°C POR 90 DIAS



LEGENDA: Análises dos parâmetros plasmáticos, do metabolismo energético e da defesa antioxidante de *Notothenia rossii* no fígado, rim, coração, músculo e brânquias, e dos índices biológicos HSI e K. Alb – albumina; Ca<sup>+2</sup> – cálcio; Col – colesterol total; CS – citrato sintase; CAT – catalase; Glg – glicogênio; Glob – globulinas; Glu – glucose; GST – glutathione-S-transferase; HSI – índice hepatossomático; K – fator de condição; LDH – lactato desidrogenase; Lip – lípidios totais; MDH – malato desidrogenase; Mg<sup>+2</sup> – magnésio; Prot – proteína total; TG – triglicerídeos; SOD – superóxido dismutase. As setas pretas representam aumento, e as setas cinzas representam diminuição. As linhas pretas representam parâmetros inalterados.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 EFEITOS DA ACLIMATAÇÃO A 8°C NOS ÍNDICES BIOLÓGICOS

Em termos de abundância e de biomassa, a subordem Notothenioidei constitui o grupo de peixes dominantes no oceano Antártico e é um importante elo da cadeia alimentar na Baía do Almirantado apresentando relevante importância para o ecossistema da região (CORBISIER et al., 2004). Estudos eco-fisiológicos de *N. rossii* em condições da natureza (RAGA et al., 2015; KLEIN et al., 2017b) e experimentais (RODRIGUES et al., 2011, 2013, 2015; MACHADO et al., 2014; FORGATI et al., 2017; SOUZA et al., 2018) têm sido realizados na região visando utilizá-los como bioindicadores de possíveis impactos cumulativos ao ambiente devido às atividades antrópicas.

A exposição prolongada ao estresse térmico pode ter consequências sobre o metabolismo, crescimento, resistência a doenças, potencial reprodutivo, condição de saúde e sobrevivência dos peixes (BARTON, 2002). A janela térmica dos organismos aquáticos é um fator tamanho dependente, reduzindo com o crescimento corpóreo do animal (PORTNER; PECK; SOMERO, 2007), sendo que juvenis de muitas espécies apresentam maior tolerância térmica quando comparados com os adultos (HANDELAND; IMSLAND; STEFANSSON, 2008). A fim de avaliar a capacidade dos indivíduos em tolerar o estresse térmico foram avaliados os índices somáticos como o K e o HSI, que indicam o grau de robustez e o estoque energético do fígado, respectivamente.

Os valores de K refletem o estado de saúde geral do peixe e difere de acordo com o fator ambiental, idade, sexo e período reprodutivo. O valor de K pode estar relacionado ao aumento ou redução da deposição de gordura no animal bem como em função das condições ambientais (BURCHETT, 1983; LIMA-JÚNIOR; GOITEIN, 2006). Em *N. rossii*, a manutenção do bem-estar foi demonstrada pela não alteração dos valores de K, nos animais mantidos em 8°C (1.70) quando comparado aos mantidos em 0°C (1.85). Estes valores encontram-se dentro da faixa observada para os animais coletados na natureza na Baía do Almirantado (1.70 - 2.31) (KAMLER, 2002; RAGA et al., 2015) e em Potter Cove (0.89-1.69) (EASTMAN; BARRERA-ORO; MOREIRA, 2011; MARK et al., 2012; STROBEL et al., 2012), localizada nas imediações da Baía do Almirantado. De

forma similar, o peixe antártico *Pachycara brachycephalum* mantido em 5°C por 10 meses (LANNIG; STORCH; PÖRTNER, 2005) e *N. rossii* mantido em 7°C por 1 mês (STROBEL et al., 2012) também não apresentaram alteração do parâmetro K. Enquanto, *Pagothenia borchgrevinki* mantido em 4°C por 5-6 semanas não manteve sua higidez provavelmente devido ao jejum durante o período experimental (LOWE; DAVISON, 2005). Neste estudo, a alimentação ou a privação alimentar não influenciou os marcadores avaliados, tendo em vista que animais controle e experimentais foram alimentados simultaneamente e a quantidade de alimento fornecida aos peixes foi padronizada de acordo com estudos prévios (CRAWFORD, 1979; EGGINTON et al., 1991; COGGAN, 1997). Para avaliar o sucesso reprodutivo e de sobrevivência, períodos de aclimação mais longos (LOWE; DAVISON, 2005), além de indivíduos em diferentes estágios de vida são necessários, a fim de estimar a plasticidade de peixes antárticos e as consequências ecológicas em temperaturas elevadas. Assim sendo, embora *N. rossii* seja adaptada a temperaturas baixas e estáveis, a manutenção do valor de K indica que os indivíduos estão fazendo uso adequado da fonte alimentar nas condições de temperatura (8°C) e tempo (90 dias) testados.

O fígado é o órgão-chave na regulação do metabolismo intermediário, contribuindo para a avaliação das condições de saúde do indivíduo e o sucesso da população devido a sua influência no crescimento, reprodução e sobrevivência. Os valores de HSI reportados neste estudo estão dentro da faixa observada para *N. rossii* em condições de natureza (temperaturas próximas a 0°C) (RAGA et al., 2015) e experimental (STROBEL et al., 2012). Em *N. rossii* a alta demanda energética em 8°C, foi demonstrada pela mobilização das reservas energéticas e com a redução do estoque lipídico dos tecidos hepático e muscular possivelmente a fim de manter a demanda energética. Ou seja, o HSI pode indicar se os peixes estão catabolizando ou anabolizando fontes de armazenamento frente a condição estressora que desencadeia um maior gasto energético ou uma maior retenção de lipídios ou glicogênio hepático (YOUNG; CHECH, 1994; OGATO; OKU, 2000). Vale lembrar que, em nototenídeos, os lipídios presentes no fígado e nas gônadas são utilizados como uma fonte rápida de energia quando requisitada (DI PRISCO, 1998; CALÌ et al., 2017). Portanto, por ser um órgão armazenador de glicogênio e lipídios, estes podem influenciar



no seu peso, interferindo também no índice hepatossomático (TAVARES-DIAS et al., 2000; BARBOSA et al., 2011).

Os resultados apresentados podem sugerir limitações nos sistemas circulatório e respiratório a fim de manter a taxa metabólica basal assim como observado por Strobel et al. (2012) e Jayasundara et al. (2013) ao submeterem peixes antárticos a temperaturas elevadas. Além disso, podem ser relacionados com as mudanças nas atividades metabólicas, as quais resultam em limitações do escopo aeróbico para a resposta da ação dinâmica específica em temperaturas elevadas (JOBLING, 1981; STROBEL et al., 2012). Acredita-se que *N. rossii* possui uma estratégia de alimentação a fim de manter uma ingestão de energia constante em diferentes temperaturas (COGGAN, 1997; VANELLA et al., 2010), como demonstrado por uma pequena variação na disponibilidade de energia durante os processos de digestão e de absorção em diferentes temperaturas (JOHNSTON; BATTRAM, 1993; VANELLA et al., 2010; STROBEL et al., 2012).

## 5.2 EFEITOS DA ACLIMATAÇÃO A 8°C NA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATOS ENERGÉTICOS NOS TECIDOS HEPÁTICO E MUSCULAR E NA COMPOSIÇÃO PLASMÁTICA

O fígado destaca-se pela capacidade de acumular substâncias de reserva, especialmente sob a forma de glicogênio e lipídios (FERGUSON, 2006), sendo que as variações no armazenamento de conteúdo energético dependem da espécie, idade, sexo, condição nutricional, maturação gonadal e de aclimação térmica. O glicogênio é uma importante reserva energética que pode ser rapidamente mobilizada durante o estresse e é considerado um indicador essencial para determinar a janela térmica ótima dos ectotérmicos aquáticos (HOCHACHKA; SOMERO, 2002). Na literatura constata-se que quando peixes são submetidos a uma única fonte de estresse por períodos prolongados não há redução no conteúdo de glicogênio hepático (BRODTE; KNUST; PÖRTNER, 2006; WINDISCH et al., 2011), ou ainda, como nesse estudo, há o aumento das reservas de glicogênio. Acredita-se que essa modificação metabólica possa promover uma maior “resistência” ao calor, tendo em vista que os carboidratos podem ser utilizados em situações de hipóxia induzida pelo calor (WINDISCH et

al., 2014). Sugere-se que após a ativação da resposta ao estresse há uma alteração da capacidade de resposta dos hormônios glicoreguladores nos hepatócitos (VIJAYAN et al., 1994).

A manutenção dos níveis glicêmicos é vital para suprir as necessidades de tecidos dependentes de glicose como o encéfalo, rins e brânquias. Fato corroborado, neste trabalho, pelo aumento das reservas de glicogênio, demonstrando que a resposta hiperglicêmica foi típica de estresse em peixes e suportada pelo aumento das reservas de glicogênio (BRODTE; KNUST; PÖRTNER, 2006; WINDISCH et al., 2011). Apesar da elevação do nível glicêmico dos animais mantidos a 8°C, esta não ocorreu devido a uma elevação dos níveis de atividade da G6Pase hepática ou renal. Enes et al. (2006) também não observaram um efeito significativo da temperatura sobre a G6Pase, mas sim sobre a atividade da frutose-1,6-bifosfatase (FBPase), indicando uma atividade gluconeogênica reforçada. Portanto, sugere-se que o aumento dos níveis de glicose plasmáticos pode ser um mecanismo compensatório para satisfazer a demanda energética em temperaturas elevadas conforme também observado por Feidantsis et al., 2009 e Ings et al., 2012. Já que a elevação da temperatura pode induzir uma condição de hipóxia nos peixes, sendo que a capacidade de manter o metabolismo anaeróbico por períodos prolongados é dependente de características intrateciduals como o conteúdo de glicogênio e a concentração de enzimas glicolíticas necessárias para degradar o glicogênio a lactato e manter o balanço redox anaeróbico (SOMERO; CHILDRESS, 1980). Dessa forma, podemos sugerir que, nesta situação, o acúmulo desta reserva esteja visando a manutenção do balanço energético, e assim, a funcionalidade tecidual. Vale ressaltar, que respostas diferenciadas em relação à concentração de glicogênio hepático podem ser observadas conforme a espécie e o tipo de estresse analisados.

Estudos mostram que os triglicerídeos atuam como rápida fonte de energia durante as condições de estresse (LOWE; DAVISON, 2005), podendo ser transportados via corrente sanguínea ligados à albumina (METCALF; GEMMELL, 2005; ADAMU; KORI-SIAKPERE, 2011), conhecida por ser a principal proteína plasmática em teleósteos (PERES et al., 2015). Os lipídios polares como o colesterol são principalmente componentes estruturais da membrana plasmática e utilizados para a síntese de hormônios como os

glicocorticóides (STUCK et al., 1996). Os níveis de proteína total (albumina e globulinas) são utilizados como indicador de condição fisiológica do peixe por ser um dos componentes mais estáveis do sangue, e neste estudo, permaneceu inalterado em *N. rossii*. Visto que, a proteína corporal é conservada às custas dos estoques de lipídios e glicogênio (WEATHERLEY; GILL, 1987). Ou seja, a proteólise ocorre somente quando as demais reservas disponíveis forem esgotadas (NAVARRO; GUTIERREZ, 1995). Entretanto, observou-se a modulação inversamente proporcional dos níveis de albumina e globulinas. Este resultado é similar ao observado durante a exposição de *N. rossii* aos efluentes do esgoto (RODRIGUES et al., 2015). A albumina apresenta relevante papel na manutenção da pressão oncótica (ANDREEVA, 2010), e é uma proteína de reserva facilmente disponível, produzida pelo fígado (JAVED; USMANI, 2015). Por isso, o seu aumento também pode ter como objetivo fornecer uma fonte proteica para atender a demanda energética elevada no tecido hepático. A elevação dos níveis plasmáticos de globulinas são associados com um sistema imune e uma resposta ao estresse mais eficientes visto o possível aumento de globulinas como a lisozima e imunoglobulinas (KUMAR et al., 2005; JHA et al., 2007).

A manutenção dos níveis plasmáticos de eletrólitos divalentes não proteicos em peixes é atribuída ao rim e intestino, os quais participam ativamente da homeostase iônica (WHITTAMORE; COOPER; WILSON, 2010), sendo responsáveis pela manutenção dos níveis de  $Mg^{+2}$  e de  $Ca^{+2}$  plasmáticos. *N. rossii* mantida a 8°C não foi capaz de manter estes níveis próximos ao do controle, possivelmente devido ao aumento da excreção contra o gradiente de concentração ou redução da absorção intestinal (WHITTAMORE, 2012). Níveis anormais de cálcio e de magnésio plasmáticos podem indicar prejuízos ao crescimento e mineralização óssea, na acumulação de lipídios, bem como na permeabilidade da membrana (PERES et al., 2015). Além do mais, o magnésio atua como um cofator para enzimas que convertem a adenosina trifosfato (ATP) em adenosina difosfato (ADP) (LIM; KLESIUS, 2003). Consequentemente, a redução dos níveis de magnésio pode prejudicar o metabolismo de carboidratos, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos.

### 5.3 EFEITOS DA ACLIMATAÇÃO A 8°C NA ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO METABOLISMO ENERGÉTICO

Neste trabalho, no coração e rim observou-se a manutenção do potencial aeróbico gerador de ATP, indicado pela não alteração dos níveis de atividade da CS de *N. rossii* mantidos a 8°C, tendo em vista que a CS reflete a entrada da acetil-CoA no ciclo dos ácidos tricarbóxílicos (TCA) após a oxidação dos carboidratos/lipídios (STROBEL et al., 2013). No coração e músculo de *Trematomus bernacchii* (JAYASUNDARA; HEALY; SOMERO, 2013) e no músculo branco de *N. rossii* (STROBEL et al., 2013) aclimatados a temperaturas de 4,5°C (por 14 dias) e a 7°C (por 29-36 dias), respectivamente, observou-se a redução dos níveis de atividade da CS, indicando um importante mecanismo de economizar energia e ajustar a demanda de oxigênio nestes tecidos (PÖRTNER, 2002; STROBEL et al., 2013). A redução do metabolismo aeróbico é esperada em virtude da limitação dos sistemas circulatório e ventilatório a fim de manter o aumento do metabolismo basal e consequentemente a maior demanda por oxigênio em altas temperaturas (PÖRTNER; KNUST, 2007; SOKOLOVA et al., 2012). Enquanto, que no fígado foi constatado o aumento da CS possivelmente a fim de manter os demais tecidos supridos energeticamente. A redução dos níveis de atividade da CS branquial direciona os intermediários do ciclo dos TCA para a gliconeogênese. Além disso, o aumento concomitante dos níveis de atividade da MDH em todos os tecidos analisados em resposta a elevação térmica pode representar um aumento da síntese de glicogênio (ALMEIDA-VAL et al., 2000; DAS et al., 2006; KUMAR et al., 2015). Já que, a enzima MDH além de catalisar reações no ciclo dos TCA auxiliando na produção de ATP por via aeróbica, também está envolvida em outras funções, como a gliconeogênese, lipogênese, manutenção do balanço redox e transporte de elétrons e cadeias de carbono entre o citosol e a mitocôndria (NELSON; COX, 2002; TORRES; GRIGSBY; CLARKE, 2012). Embora *N. rossii* mantenha o fluxo glicolítico através do ciclo do ácido cítrico nos rins e brânquias quando submetidos a temperatura de 8°C por até 6 dias (FORGATI et al., 2017), em períodos maiores, como neste estudo, se mostra necessária uma reorganização da maquinaria metabólica, a fim de direcionar os precursores do ciclo do TCA para a realização da

gliconeogênese para que as demandas energéticas de *N. rossii* sejam supridas na situação de estresse.

A elevação dos níveis de atividade da LDH indica que o potencial anaeróbico dos músculos branco e cardíaco de *N. rossii* foi elevado frente ao aumento térmico. Assim como observado no músculo branco de *N. rossii* submetido ao estresse térmico por 6 dias (SOUZA et al., 2018). De forma distinta, no tecido cardíaco, Souza et al. (2018) sugerem que o aumento da atividade da LDH a curto prazo (3 dias a 8°C) seja decorrente da isoforma LDH-H que permite a conversão de lactato em piruvato, possibilitando, dessa forma, uma maior oferta de piruvato para o ciclo do ácido tricarboxílico. Enquanto que, o peixe antártico *Trematomus bernacchii* submetido à temperatura de 4,5°C, apresentou relação constante da taxa de LDH e CS, sugerindo que tanto o metabolismo aeróbico quanto o anaeróbico não foram alterados devido ao aumento térmico (JAYASUNDARA; HEALY; SOMERO, 2013). O aumento da atividade da LDH também foi observado na larva do peixe tropical *Oryzias melastigma* (LI et al., 2015) e em diferentes órgãos do peixe tropical *Labeo rohita* (DALVI et al., 2017) expostos a temperaturas quentes. Estes resultados sugerem que houve uma reorganização da maquinaria metabólica a fim de manter a produção de ATP frente à maior demanda energética ocasionada pela temperatura de 8°C.

#### 5.4 EFEITOS DA ACLIMATAÇÃO A 8°C NAS ATIVIDADES DAS ENZIMAS DA DEFESA ANTIOXIDANTE

Os elevados níveis de oxigênio dissolvido na água do mar e a alta densidade mitocondrial em peixes antárticos (STROBEL et al., 2013b) contribui para uma maior produção de EROs (REGOLI et al., 2005). Consequentemente, o sistema de defesa antioxidante apresenta níveis constitutivos elevados em organismos que habitam águas geladas, indicando que os nototenídeos devem ter perdido a habilidade de elevar os níveis de antioxidantes em resposta ao estresse térmico (MUELLER et al., 2012). Além disso, com a redução do metabolismo aeróbico pode-se justificar a redução dos níveis de atividade da SOD, CAT e GST nos tecidos avaliados, excetuando-se a SOD renal. O rim, devido ao elevado custo energético envolvido na osmorregulação, apresenta grande potencial oxidativo (LUSHCHAK et al., 2005; TSENG; HWANG, 2008). Portanto, nesse estudo, observa-se que houve a necessidade da elevação da

atividade da SOD a fim de compensar o possível aumento da produção de EROs como resultado do aumento térmico. Diferentemente dos demais tecidos, o músculo branco de nototenídeos, que fornece potência para a natação intensiva de curto prazo, apresenta baixa capilaridade e conteúdo mitocondrial (LONDRAVILLE; SIDELL, 1990), consequentemente o metabolismo oxidativo é menos intenso. Tal fato é corroborado pela menor atividade da SOD muscular em relação aos demais tecidos analisados e com resultados semelhantes aos relatados para *N. rossii* em condições de natureza e expostos ao aumento da temperatura (KLEIN et al., 2017a, 2017b; SOUZA et al., 2018). A atividade da CAT aumentou nas brânquias, enquanto a CAT e a GST reduziram no coração frente ao aquecimento, sugerindo-se que após longos períodos de aclimação, o estresse oxidativo foi reduzido nesses tecidos. A ausência ou ainda a modulação negativa da CAT pode ser relacionada a ação da glutathione peroxidase (GPx) e da peroxiredoxina (PRx), já que também atuam na degradação de peróxidos (RHEE et al., 2005). O aumento da atividade da GPx foi observado no tecido cardíaco de *N. rossii* submetida a 8°C por 3 dias (SOUZA et al., 2018). O aquecimento de 8°C avaliado em *N. rossii* por até seis dias indica que ao longo do tempo há uma inibição da atividade da CAT e SOD hepáticas (MACHADO et al., 2014). Em períodos longos não houve modulação dos níveis de atividade da CAT hepática em *P. borchgrevinki* submetidos a temperatura de 4°C por 3 semanas (CARNEY ALMROTH et al., 2015) e em *Trematomus newnesi*, *T. bernacchii* e *P. borchgrevinki* mantidos por períodos entre 7 e 56 dias a 4°C sugerindo-se que os níveis das enzimas antioxidantes são suficientes frente a elevação térmica (ENZOR; PLACE, 2014). Os novos níveis de antioxidantes constatados neste estudo podem indicar que *N. rossii* aclimatou-se às condições de elevada temperatura em 90 dias, estabelecendo uma nova faixa fisiológica de ação enzimática.

## 6 CONCLUSÕES

Nossos dados mostram que *N. rossii* possui mecanismos compensatórios parciais para a sobrevivência em temperaturas elevadas (8°C) por 90 dias. Há indícios de redução dos estoques de lipídios como resultado das alterações na demanda energética para o suporte da sobrevivência. A resposta compensatória foi tecido-específica, havendo redução do metabolismo aeróbico nas brânquias, representado pela diminuição dos níveis de CS, sendo um mecanismo de redução de gastos energéticos a fim de conter o aumento do metabolismo basal. Os aumentos da atividade da MDH e da LDH sugerem que ocorreu um ajuste nos órgãos gliconeogênicos e nos dependentes de glicose perante o aumento térmico e, assim, a manutenção de suas respectivas funções. Os resultados mostram que o fígado foi capaz de modificar as vias do metabolismo energético utilizando como principal substrato energético a glicose, ao invés de lipídios, para suprir a demanda metabólica imposta pela nova condição térmica. Quanto a defesa antioxidante podemos considerar que os níveis mais baixos da SOD, CAT e GST observados na condição de elevação térmica podem indicar que o sistema de defesa antioxidante possivelmente é suficiente para prevenir contra os danos ocasionados pela ação das EROs.

## REFERÊNCIAS

- ABELE, D.; TESCH, C.; WENCKE, P.; PÖRTNER, H.O. How do oxidative stress parameters relate to thermal tolerance in the Antarctic bivalve *Yoldia eightsi*? **Antarctic Science**, v. 13, p. 111-118, 2001.
- ABELE, D.; PUNTARULO, S. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 138, n. 4, p. 405-415, 2004.
- ADAMU, K. M.; KORI-SIAKPERE, O. Effects of sublethal concentrations of tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaf dust on some biochemical parameters of Hybrid catfish (*Clarias gariepinus* and *Heterobranchus bidorsalis*). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 1, p. 183-196, 2011.
- ALLAIN, C. C.; POON, L. S.; CHAN, C. S. G.; RICHMOND, W.; FU P. C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clinical Chemistry**, v. 20, p. 470-475, 1974.
- ALMEIDA-VAL, V. M. F.; VAL, A. L.; DUNCAN, W. P.; SOUZA, F. C. A.; PAULA-SILVA, M. N.; LAND, S. Scaling effects on hypoxia tolerance in the Amazon fish *Astronotus ocellatus* (Perciformes: Cichlidae): contribution of tissue enzyme levels. **Comp Biochemistry and Physiology**, v. 125, p. 219-226, 2000.
- ANDREEVA, A. M. The role of structural organization of blood plasma proteins in the stabilization of water metabolism in bony fish (Teleostei). **Journal of Ichthyology**, v. 50, n. 7, p. 552-558, 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1134/S0032945210070076>>.
- BARBOSA, M.C.; JATOBÁ, A.; VIEIRA, F. N. Cultivation of juvenile fat snook (*Centropomus parallelus* Poey, 1860) fed probiotic in laboratory conditions. **Brazilian Archives of Biology Technology**, v. 54, p. 795-801, 2011.
- BARTON, B. A. Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, v. 42, n. 3, p. 517-525, 2002. Disponível em: <<https://academic.oup.com/icb/article-lookup/doi/10.1093/icb/42.3.517>>.
- BEUTLER, E. **Red cell metabolism: a manual of biochemical methods**. New York: Grune & Stratton, p.160, 1975.
- BIDINOTO, P. M.; MORAES, G.; SOUZA, R. H. S. Hepatic glycogen and glucose in eight tropical fresh water teleost fish: a procedure for field determinations of micro samples. **Boletim Técnico CEPTA Pirassununga** v. 10, p. 53-60, 1997.
- BILYK, K. T.; DE VRIES, A. L. Heat tolerance and its plasticity in Antarctic fishes. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, v. 158, p. 382-90, 2011.



BILYK, K. T.; EVANS, C. W.; DEVRIES, A. L. Heat hardening in Antarctic notothenioid fishes. **Polar Biology**, v. 35, n. 9, p. 1447–1451, 2012.

BLASCO, J.; MARIMÓN, I.; VIAPLANA, I.; FERNÁNDEZ-BORRÁS, J. Fate of plasma glucose in tissues of brown trout in vivo: Effects of fasting and glucose loading. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 24, n. 3, p. 247–258, 2001.

BOOTH, D. J.; BOND, N.; MACREADIE, P. Detecting range shifts among Australian fishes in response to climate change. **Marine and Freshwater Research**, v. 62, n. 9, p. 1027–1042, 2011.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRODTE, E.; KNUST, R.; PÖRTNER, H. O. Temperature-dependent energy allocation to growth in Antarctic and boreal eelpout (Zoarcidae). **Polar Biology**, v. 30, n. 1, p. 95–107, 2006.

BRODTE, E.; GRAEVE, M.; JACOB, U.; KNUST, R.; PÖRTNER, H. O. Temperature-dependent lipid levels and components in polar and temperate eelpout (Zoarcidae). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 34, n. 3, p. 261–274, 2008.

BUCOLO, G.; DAVID, H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. **Clinical Chemistry**, v. 19, p. 476-482, 1973.

BURCHETT, M. S. Morphology and morphometry of the Antarctic Nototheniid *Notothenia rossii marmorata*. **British Antarctic Survey Bulletin**, v. 58, p. 71-81, 1983.

CALI, J. P.; BOWERS, G. N.; YOUNG, J. D. S. (1973) A referee method for the determination of total calcium in serum. **Clinical Chemistry**, v. 19, p. 1208-1213.

CALÌ, F.; RIGINELLA, E.; LA MESA, M.; MAZZOLDI, C. Life history traits of *Notothenia rossii* and *N. coriiceps* along the southern Scotia Arc. **Polar Biology**, v. 40, n. 7, p. 1409–1423, 2017.

CARNEY ALMROTH, B.; ASKER, N.; WASSMUR, B.; ROSENGREN, M.; JUTFELT, F.; GRÄNS, A.; SUNDELL, K.; AXELSSON, M.; STURVE, J. Warmer water temperature results in oxidative damage in an antarctic fish, the bald notothen. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 468, p. 130–137, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jembe.2015.02.018>>.

CHILDRESS, J. J.; SOMERO, G. N. Depth-related enzymic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts. **Marine Biology**, v. 52, p. 273-283, 1979.

CLARKE, A. What is cold adaptation and how should we measure it? **American Zoologist**, v. 31, p. 81-92, 1991.

CLARKE, A.; MURPHY, E.J.; MEREDITH, M. P.; KING, J. C.; PECK, L. S.; BARNES, D. K. A.; SMITH, R. C. Climate change and the marine ecosystem of the western Antarctic Peninsula. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 362, p. 149-166, 2007.

COGGAN, R. Growth:Ration relationships in the antarctic fish *Notothenia coriiceps* Richardson maintained under different conditions of temperature and photoperiod. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 210, n. 1, p. 23–35, 1997.

CORBISIER, T. N.; PETTI, M. A. V.; SKOWRONSKI, R. S. P.; BRITO, T. A. S. Trophic relationships in the nearshore zone of Martel Inlet (King George Island, Antarctica):  $\delta^{13}\text{C}$  stable-isotope analysis. **Polar Biology**, v. 27, p. 75-82, 2004.

CRAWFORD, R. E. Effect of starvation and experimental feeding on the proximate composition and caloric content of an antarctic teleost, *Notothenia coriiceps neglecta*. **Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology**, v. 62, n. 2, p. 321–326, 1979.

CROUCH, R. K.; GANDY, S. C.; KINSEY, G. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. **Diabetes**, v. 30: p. 235-241, 1981.

DALVI, R. S.; DAS, T.; DEBNATH, D.; YENGKOKPAM, S.; BARUAH, K.; TIWARI, L. R.; PAL, A. K. Metabolic and cellular stress responses of catfish, *Horabagrus brachysoma* (Günther) acclimated to increasing temperatures. **Journal of Thermal Biology**, v. 65, n. February, p. 32–40, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jtherbio.2017.02.003>>.

DAS, T.; PAL, A.K.; CHAKRABORTY, S. K.; MANUSH, S. M.; CHATTERJEE, N.; APTE, S. K. Metabolic elasticity and induction of heat shock protein 70 in *Labeo rohita* acclimated to three temperatures. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 19, p. 1033-1039, 2006.

DI PRISCO, G. (1998). Molecular adaptations in Antarctic fish hemoglobins. In: di Prisco G, Pisano E, Clarke A. Eds. **Fishes of Antarctica**. A Biological Overview. Springer, Milano, pp. 339–353.

DOUMAS, B.T.; WATSON, W. A.; BIGGS, H. G. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. **Clinica Chimica Acta**, v. 31, p. 87-96, 1971.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-355, 1956.

DUNN, J. F.; JOHNSTON, I. A. Metabolic constraints on burst-swimming in the Antarctic teleost *Notothenia neglecta*. **Marine Biology**, v. 91, p. 433-440, 1986.

EASTMAN, J. T.; BARRERA-ORO, E.; MOREIRA, E. Adaptive radiation at a low taxonomic level: Divergence in buoyancy of the ecologically similar Antarctic fish *Notothenia coriiceps* and *N. rossii*. **Marine Ecology Progress Series**, v. 438, p. 195–206, 2011.

EGGINTON, S.; TAYLOR, E. W.; WILSON, R. W.; JOHNSTON, I. A.; MOON, T. W. Stress response in the Antarctic teleosts (*Notothenia neglecta* Nybelin and *N. rossii* Richardson). **Journal of Fish Biology**, v. 38, p. 225–235, 1991.

ENZOR, L. A.; PLACE, S. P. Is warmer better? Decreased oxidative damage in notothenioid fish after long-term acclimation to multiple stressors. **Journal of Experimental Biology**, v. 217, n. 18, p. 3301–3310, 2014. Disponível em: <<http://jeb.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jeb.108431>>.

FERGUSON, H.W. **Systemic pathology of fish**: a text and atlas of normal tissues in teleosts and their responses in disease. 2<sup>nd</sup> ed. London: Scotian, 2006. 366p.

FOLCH, J.; LESS, M.; STANLEY, S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 497-509, 1957.

FORGATI, M.; KANDALSKI, P. K.; HERRERIAS, T.; ZALESKI, T.; MACHADO, C.; SOUZA, M. R. D. P.; DONATTI, L. Effects of heat stress on the renal and branchial carbohydrate metabolism and antioxidant system of Antarctic fish. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 0, n. 0, p. 1–18, 2017.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. S.; DAVID, M. M. Determination of serum protein by means of the biuret reaction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 177, p. 751-766, 1949.

GUDERLEY, Helga. Metabolic responses to low temperature in fish muscle. **Biological reviews**, v. 79, n. 2, p. 409-427, 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford University Press, Oxford, 2007.

HANDELAND, S. O.; IMSLAND, A. K.; STEFANSSON, S. O. The effect of temperature and fish size on growth, feed intake, food conversion efficiency and stomach evacuation rate of Atlantic salmon post-smolts. **Aquaculture**, v. 283, n. 1–4, p. 36–42, 2008.

HOCHACHKA, P. W.; SOMERO, G. N. **Biochemical adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution**. New York: Oxford University Press, 2002.

IPCC. **Climate Change 2014**: impacts, adaptation and vulnerability-contributions of the working group II to the Fifth Assessment Report. Summary for Policymakers, 2014.

JAVED, M.; USMANI, N. Stress response of biomolecules (carbohydrate, protein and lipid profiles) in fish *Channa punctatus* inhabiting river polluted by Thermal Power Plant effluent. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 22, n. 2, p. 237–242, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.09.021>>.

JAYASUNDARA, N.; HEALY, T. M.; SOMERO, G. N. Effects of temperature acclimation on cardiorespiratory performance of the Antarctic notothenioid *Trematomus bernacchii*. **Polar Biology**, v. 36, n. 7, p. 1047–1057, 2013.

JHA, A. K.; PAL, A. K.; SAHU, N. P.; KUMAR, S.; MUKHERJEE, S. C. Haemato-immunological responses to dietary yeast RNA,  $\omega$ -3 fatty acid and  $\beta$ -carotene in *Catla catla* juveniles. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 23, n. 5, p. 917–927, 2007.

JOBLING, M. The influences of feeding on the metabolic rate of fishes: a short review. **Journal of Fish Biology**, v. 18, p. 385–400, 1981.

JOHNSTON, I. A.; BATTRAM, J. Feeding energetics and metabolism in demersal fish species from Antarctic, temperate and tropical environments. **Marine Biology**, v. 115, n. 1, p. 7–14, 1993.

JOHNSTON, I. A.; CALVO, J.; GUDERLEY, H.; FERNANDEZ, D.; PALMER, L. Latitudinal variation in the abundance and oxidative capacities of muscle mitochondria in perciform fishes. **Journal of Experimental Biology**, v. 201, p. 1–12, 1998.

KAMLER, E. Inter – individual and seasonal variability of biological indices in notothenioid fishes from Admiralty Bay , Antarctica. v. 23, n. 3, p. 265–278, 2002.

KAWALL, H. G.; TORRES, J. J.; SIDELL, B. D.; SOMERO, G. N. Metabolic cold adaptation in Antarctic fishes: Evidence from enzymatic activities of brain. **Marine Biology**, v. 140, n. 2, p. 279–286, 2002.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for Several Activities of the Glutathione S transferases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, p. 6183–6188, 1976.

KLEIN, R. D.; BORGES, V. D.; ROSA, C. E.; COLARES, E. P.; ROBALDO, R. B.; MARTINEZ, P. E.; BIANCHINI, A. Effects of increasing temperature on antioxidant defense system and oxidative stress parameters in the Antarctic fish *Notothenia coriiceps* and *Notothenia rossii*. **Journal of Thermal Biology**, v. 68, n. February, p. 110–118, 2017a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jtherbio.2017.02.016>>.

KLEIN, R. D.; ROSA, C. E.; COLARES, E. P.; ROBALDO, R. B.; MARTINEZ, P. E.; BIANCHINI, A. Antioxidant defense system and oxidative status in Antarctic

fishes: The sluggish rockcod *Notothenia coriiceps* versus the active marbled notothen *Notothenia rossii*. **Journal of Thermal Biology**, v. 68, n. February, p. 119–127, 2017b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jtherbio.2017.02.013>>.

KUMAR, S.; SAHU, N. P.; PAL, A. K.; CHOUDHURY, D.; YENGKOKPAM, S.; MUKHERJEE, S. C. Effect of dietary carbohydrate on haematology, respiratory burst activity and histological changes in *L. rohita* juveniles. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 19, n. 4, p. 331–344, 2005.

KUMAR, P.; PAL, A. K.; SAHU, N. P.; JHA, A. K.; PRIYA, P. Biochemical and physiological stress responses to heat shock and their recovery in *Labeo rohita* fingerlings. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 85, p. 485–490, 2015.

LANNIG, G.; STORCH, D.; PÖRTNER, H. O. Aerobic mitochondrial capacities in Antarctic and temperate eelpout (Zoarcidae) subjected to warm versus cold acclimation. **Polar Biology**, v. 28, n. 8, p. 575–584, 2005.

LI, A. J.; LEUNG, P. T. Y.; BAO, V. W. W.; LUI, G. C. S.; LEUNG, K. M. Y. Temperature-dependent physiological and biochemical responses of the marine medaka *Oryzias melastigma* with consideration of both low and high thermal extremes. **Journal of Thermal Biology**, v. 54, p. 98–105, 2015.

LIM, C.; KLESIOUS, P. H. Influence of dietary levels of magnesium on growth, tissue mineral content, and resistance of channel catfish *Ictalurus punctatus* challenged with *Edwardsiella ictaluri*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 34, n. 1, p. 18–28, 2003.

LIMA-JUNIOR, S. E.; GOITEIN, R. Fator de condição e ciclo gonadal de fêmeas de *Pimelodus maculatus* (Osteichthyes, Pimelodidae) no rio Piracicaba (SP, Brasil). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 32, p. 87–94, 2006.

LINKOWSKI, T. B.; ŻUKOWSKI, C. Observation on the growth of *Notothenia coriiceps neglecta* Nybelin and *Notothenia rossii marmorata* Fischer in Admiralty Bay (King George Island South Shetland Islands). **Polish Polar Research**, v. 1, p. 155–162, 1980.

LLORET, J. Effects of large-scale habitat variability on condition of demersal exploited fish in the north-western Mediterranean. **ICES Journal of Marine Science**, v. 59, p. 1215–1227, 2002. doi: 10.1006/jmsc.2002.1294

LONDRAVILLE, R. L.; SIDELL, B. D. Ultrastructure of aerobic muscle in antarctic fishes may contribute to maintenance of diffusive fluxes. **Journal of Experimental Biology**, v. 150, p. 205–220, 1990.

LOWE, C. J.; DAVISON, W. Plasma osmolarity, glucose concentration and erythrocyte responses of two Antarctic nototheniid fishes to acute and chronic thermal change. **Journal of Fish Biology**, v. 67, n. 3, p. 752–766, 2005.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, p. 267-275, 1951.

LUSHCHAK, V. I.; BAGNYUKOVA, T. V.; LUSHCHAK, O. V.; STOREY, J. M.; STOREY, K. B. Hypoxia and recovery perturb free radical processes and antioxidant potential in common carp (*Cyprinus carpio*) tissues. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 37, n. 6, p. 1319–1330, 2005.

LUSHCHAK, V. I.; BAGNYUKOVA, T. V. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 2. Antioxidant and associated enzymes. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 143, p. 36–41, 2006a. doi: 10.1016/j.cbpc.2005.11.018

LUSHCHAK, V. I.; BAGNYUKOVA, T. V. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 1. Indices of oxidative stress. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 143, p. 30–35, 2006b . doi: 10.1016/j.cbpc.2005.11.017

MACHADO, C.; ZALESKI, T.; RODRIGUES, E.; CARVALHO, C. dos S.; CADENA, S. M. S. C.; GOZZI, G. J.; KREBSBACH, P.; RIOS, F. S. A.; DONATTI, L. Effect of temperature acclimation on the liver antioxidant defence system of the Antarctic nototheniids *Notothenia coriiceps* and *Notothenia rossii*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 172–173, n. 1, p. 21–28, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2014.02.003>>.

MARK, F. C.; LUCASSEN, M.; STROBEL, A.; BARRERA-ORO, E.; KOSCHNICK, N.; ZANE, L.; PATARNELLO, T.; PÖRTNER, H. O.; PAPETTI, C. Mitochondrial function in antarctic nototheniids with ND6 translocation. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, 2012.

MARTINS, C. I. M.; SCHRAMA, J. W.; VERRETH, J. A. J. The relationship between individual differences in feed efficiency and stress response in African catfish *Clarias gariepinus*. **Aquaculture**, v. 256, p. 588-595, 2006.

MEREDITH, M. P.; KING, J. C. Rapid climate change in the ocean west of the Antarctic Peninsula during the second half of the 20th century. **Geophysical Research Letters**, v. 32, n. 19, p. 1–5, 2005.

METCALF, V. J.; GEMMELL, N. J. Fatty acid transport in cartilaginous fish: Absence of albumin and possible utilization of lipoproteins. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 31, n. 1, p. 55–64, 2005.

MINTENBECK, K.; BARRERA-ORO, E. R.; BREY, T.; JACOB, U.; KNUST, R.; MARK, F. C.; MOREIRA, E.; STROBEL, A.; ARNTZ, W. E. **Impact of Climate Change on Fishes in Complex Antarctic Ecosystems**. [s.l.: s.n.].v. 46

MUELLER, I. A.; GRIM, J. M.; BEERS, J. M.; CROCKETT, E. L.; O'BRIEN, K. M. Inter-relationship between mitochondrial function and susceptibility to oxidative

stress in red- and white-blooded Antarctic notothenioid fishes. **Journal of Experimental Biology**, v. 214, n. 22, p. 3732–3741, 2011. Disponível em: <<http://jeb.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jeb.062042>>.

MUELLER, I. A.; DEVOR, D. P.; GRIM, J. M.; BEERS, J. M.; CROCKETT, E. L.; O'BRIEN, K. M. Exposure to critical thermal maxima increases oxidative stress in hearts of white- but not red-blooded Antarctic notothenioid fishes. **Journal of Experimental Biology**, v. 215, n. 20, p. 3655–3664, 2012. Disponível em: <<http://jeb.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jeb.071811>>.

MUELLER, I.; HOFFMAN, M.; DULLEN, K.; O'BRIEN, K. Moderate elevations in temperature do not increase oxidative stress in oxidative muscles of Antarctic notothenioid fishes. **Polar Biology**, v. 37, p. 311–320, 2014.

NAVARRO, I.; GUTIERREZ, J. Fasting and Starvation. In *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes* (Hochachka, P.W. e Mommsen, T.P., eds), New York: Elsevier. 4: 393–433, 1995.

NELSON D. L.; COX, M. M. Lehninger **Princípios de Bioquímica**. 3ª Edição. São Paulo: Sarvier, 2002.

OGATA, H. Y.; OKU, H. Effects of water velocity on growth performance of juvenile flounder *Paralichthys olivaceus*. **Journal World Aquaculture Society**, v. 31: 225–231, 2000.

PECK, L. S. Ecophysiology of Antarctic marine ectotherms: limits to life. **Polar Biology**, v. 25, p. 31–40, 2002.

PEDRO, J. B.; MARTIN, T.; STEIG, E. J.; JOCHUM, M.; PARK, W.; RASMUSSEN, S. O. Southern Ocean deep convection as a driver of Antarctic warming events. **Geophys Res Lett** 43:2192–2199, 2016. doi: 10.1002/2016GL067861

PERES, H.; COSTAS, B.; PEREZ-JIMENEZ, A.; GUERREIRO, I.; OLIVATELES, A. Reference values for selected hematological and serum biochemical parameters of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) juveniles under intensive aquaculture conditions. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 31, n. 1, p. 65–71, 2015.

PODRABSKY, J. E.; SOMERO, G. N. Inducible heat tolerance in Antarctic notothenioid fishes. **Polar Biology**, v. 30, n. 1, p. 39–43, 2006.

PÖRTNER, H. O. Climate variation and physiology basis to temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. **Comparative and Biochemical Physiology**, v. 132A, n. April 2001, p. 739–761, 2002.

PÖRTNER, H. O.; LUCASSEN, M.; STORCH, D. Metabolic biochemistry: its role in thermal tolerance and in the capacities of physiological and ecological function.

In: Farrell A.P., J. F. Steffensen (Eds.), **The Physiology of Polar Fishes**. Fish Physiology (Randall, D.R., Farrell, A.P., Eds.), v. 22, p. 79-154, 2005.

PÖRTNER, H. O.; KNUST, R. Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. **Science**, v. 315, p. 95-97, 2007.

PÖRTNER, H. O.; FARRELL, A. P. Physiology and climate change. **Science** v. 322, p. 690-692, 2008.

RAGA, G.; PICHLER, H. A.; ZALESKI, T.; DA SILVA, F. B. V.; MACHADO, C.; RODRIGUES, E.; KAWALL, H. G.; RIOS, F. S.; DONATTI, L. Ecological and physiological aspects of the antarctic fishes *Notothenia rossii* and *Notothenia coriiceps* in Admiralty Bay, Antarctic Peninsula. **Environmental Biology of Fishes**, v. 98, n. 3, p. 775–788, 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10641-014-0311-2>>.

REGOLI, F.; PRINCIPATO, G. B.; BERTOLI, E.; NIGRO, M.; ORLANDO, E. Biochemical characterization of the antioxidant system in the scallop *Adamussium colbecki*, a sentinel organism for monitoring the Antarctic environment. **Polar Biology**, v. 17, p. 251-258, 1997.

REGOLI, F.; NIGRO, M.; BENEDETTI, M.; FATTORINI, D.; GORBI, S. Antioxidant efficiency in early life stages of the Antarctic silverfish, *Pleuragramma antarcticum*: Responsiveness to pro-oxidant conditions of platelet ice and chemical exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 75, p. 43-52, 2005.

RHEE, S. G.; YANG, K. S.; KANG, S. W.; WOO, H. A.; CHANG, T. S. Controlled elimination of intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via post-translational modification. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 7, p. 619-626, 2005.

ROBINSON, E.; DAVISON, W. The Antarctic notothenioid fish *Pagothenia borchgrevinki* is thermally flexible: Acclimation changes oxygen consumption. **Polar Biology**, v. 31, n. 3, p. 317–326, 2008.

RODRIGUES, E.; SUDA, C. N. K.; RODRIGUES, E.; DE OLIVEIRA, M. F.; DOS SANTOS CARVALHO, C.; VANI, G. S. Respostas Metabólicas de peixes Antárticos como marcadores de impacto ambiental. **Oecologia Australis**, v. 15, n. 1, p. 124–149, 2011.

RODRIGUES, E.; FEIJÓ-OLIVEIRA, M.; VANI, G. S.; SUDA, C. N. K.; CARVALHO, C. S.; DONATTI, L.; LAVRADO, H. P.; RODRIGUES, E. Interaction of warm acclimation, low salinity, and trophic fluoride on plasmatic constituents of the Antarctic fish *Notothenia rossii* Richardson, 1844. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 6, p. 1591–1601, 2013.

RODRIGUES, E.; FEIJÓ-OLIVEIRA, M.; SUDA, C. N. K.; VANI, G. S.; DONATTI, L.; RODRIGUES, E.; LAVRADO, H. P. Metabolic responses of the Antarctic fishes *Notothenia rossii* and *Notothenia coriiceps* to sewage pollution. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1205–1220, 2015.



SABOROWSKI, I. R.; BUCHHOLZ, F. Metabolic properties of Northern krill, *Meganyctiphanes norvegica*, from different climatic zones. II. Enzyme characteristics and activities. **Marine Biology**, v. 140, p. 557-565, 2002.

SCHALES, O.; SCHALES, S. J. A simple and accurate method for the determination of chloride in biological fluids. **Journal of Biological Chemistry**, v. 140, p. 879-884, 1941.

SCHRECK, C. B. Stress and compensation in teleostean fishes: response to social and physical factors. In: Pickering AD, editor. **Stress and fish**. London: Academic Press, p.295-321, 1981.

SEEBACHER, F.; DAVISON, W.; LOWE, C. J.; FRANKLIN, C. E. A falsification of the thermal specialization paradigm: compensation for elevated temperatures in Antarctic fishes. **Biology Letters**, v. 1, n. 2, p. 151–4, 2005. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1626235&tool=pmc&entrez&rendertype=abstract>>.

SOKOLOVA, I. M.; FREDERICH, M.; BAGWE, R.; LANNIG, G.; SUKHOTIN, A. A. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. **Marine Environmental Research**, v. 79, p. 1–15, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.04.003>>.

SOMERO, G. N.; DE VRIES, A. L. Temperature tolerance of some antarctic fishes. **Science**, v. 156, p. 257, 1967.

SOUZA, M. R. D. P.; HERRERIAS, T.; ZALESKI, T.; FORGATI, M.; KANDALSKI, P. K.; MACHADO, C.; SILVA, D. T.; PIECHNIK, C. A.; MOURA, M. O.; DONATTI, L. Heat stress in the heart and muscle of the Antarctic fishes *Notothenia rossii* and *Notothenia coriiceps*: Carbohydrate metabolism and antioxidant defence. **Biochimie**, v. 146, p. 43-55, 2018. doi: 10.1016/j.biochi.2017.11.010.

STROBEL, A.; BENNECKE, S.; LEO, E.; MINTENBECK, K.; PÖRTNER, H. O.; MARK, F. C. Metabolic shifts in the Antarctic fish *Notothenia rossii* in response to rising temperature and PCO<sub>2</sub>. **Frontiers in Zoology**, v. 9, n. 1, p. 28, 2012.

STROBEL, A.; GRAEVE, M.; PÖRTNER, H. O.; MARK, F. C. Mitochondrial acclimation capacities to ocean warming and acidification are limited in the Antarctic nototheniid fish, *Notothenia rossii* and *Lepidonotothen squamifrons*. **PLoS ONE**, v. 8, :e68865, 2013a. doi:10.1371/journal.pone.0068865.

STROBEL, A.; LEO, E.; PÖRTNER, H. O.; MARK, F. C. Elevated temperature and PCO<sub>2</sub> shift metabolic pathways in differentially oxidative tissues of *Notothenia rossii*. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, v. 166, p. 48-57, 2013b.

STUCK, K. C. et al. Relationship between BP (*Baculovirus penaei*) and energy reserves in larval and postlarval Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*.

**Diseases of Aquatic Organisms**, v. 24, n. 3, p. 191–1981, 1996.

TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M. L.; MORAES, F. R. Relação hepatossomática em peixes teleósteos de cultivo intensivo. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 17, 273-281, 2000.

THORNE, M. A. S.; BURNS, G.; FRASER, K. P. P.; HILLYARD, G.; CLARK, M. S. Transcription profiling of acute temperature stress in the Antarctic plunderfish *Harpagifer antarcticus*. **Marine Genomics**, v. 3, n. 1, p. 35–44, 2010.

THUESEN, E. V.; MCCULLOUGH, K. D.; CHILDRESS, J. J. Metabolic enzyme activities in swimming muscle of medusae: is the scaling of glycolytic activity related to oxygen availability? **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 85, p. 603-611, 2005.

TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 6, p. 24-5, 1969.

TSENG, Y. C.; HWANG, P. P. Some insights into energy metabolism for osmoregulation in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 148, n. 4, p. 419–429, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.04.009>>.

TURNER, J.; BARRAND, N. E.; BRACEGIRDLE, T. J.; CONVEY, P.; HODGSON, D. A.; JARVIS, M.; JENKINS, A.; MARSHALL, G.; MEREDITH, M. P.; ROSCOE, H.; SHANKLIN, J. Antarctic climate change and the environment: an update. **Polar Record** (Gr Brit) v. 50, p. 237–259, 2014. doi: 10.1017/S0032247413000296

VAN DE NIEUWEGIESSEN, P. G.; BOERLAGE, A. S.; VERRETH, J. A. J.; SCHRAMA, J. W. Assessing the effects of a chronic stressor, stocking density, on welfare indicators of juvenile African catfish, *Clarias gariepinus* Burchell. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 115, p. 233-243, 2008.

VANELLA, F. A.; BOY, C. C.; LATTUCA, M. E.; CALVO, J. Temperature influence on post-prandial metabolic rate of sub-Antarctic teleost fish. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 156, n. 2, p. 247–254, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.02.006>>.

VAZZOLER, A. E. A. M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Universidade Estadual de Maringá, Editora, 1996.

VERDE, C.; PARISI, E.; DI PRISCO, G. The evolution of thermal adaptation in polar fish. **Gene**, v. 385, p. 137–145, 2006.

VIJAYAN, M. M.; REDDY, P. K.; LEATHERLAND, J. F.; MOON, T. W. The effects of cortisol on hepatocyte metabolism in rainbow trout: a study using the steroid

analogue RU486. **General and Comparative Endocrinology**, v. 96, p. 75-84, 1994.

WEATHERLEY, A. H.; GILL, H. S. Dynamics of muscle growth in fish. In WEATHERLEY, AH GILL, HS. *The Biology of Fish Growth*. Academic Press, Inc., 150-161 p, 1987.

WHITTAMORE, J. M.; COOPER, C. a; WILSON, R. W. HCO<sub>2</sub><sup>-</sup> secretion and CaCO<sub>3</sub> precipitation play major roles in intestinal water absorption in marine teleost fish in vivo. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 298, p. R877–R886, 2010.

WHITTAMORE, J. M. Osmoregulation and epithelial water transport: Lessons from the intestine of marine teleost fish. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 182, n. 1, p. 1–39, 2012.

WINDISCH, H. S.; KATHÖVER, R.; PÖRTNER, H. O.; FRICKENHAUS, S.; LUCASSEN, M. Thermal acclimation in antarctic fish: Transcriptomic profiling of metabolic pathways. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 301, p.1453-1466, 2011.

WINDISCH, H. S.; FRICKENHAUS, S.; JOHN, U.; KNUST, R.; PÖRTNER, H. O.; LUCASSEN, M. Stress response or beneficial temperature acclimation: Transcriptomic signatures in Antarctic fish (*Pachycara brachycephalum*). **Molecular Ecology**, v. 23, n. 14, p. 3469–3482, 2014.

YOUNG, P. S.; CECH JR. Effects of different exercise conditioning velocities on the energy reserves and swimming stress responses in young-of-the-year striped bass (*Morone saxatilis*). **Canadian Journal of Fish and Aquatic Sciences**, v. 51, p. 1528-1534, 1994.

## CAPÍTULO II

### **Avaliação do efeito do estresse térmico agudo no tecido renal dos nototenídeos antárticos *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps* através de biomarcadores fisiológicos e bioquímicos**

#### **RESUMO**

O ecossistema marinho Antártico evoluiu de forma que os organismos ali viventes apresentam características metabólicas únicas que permitem a sua sobrevivência sob condições de temperaturas baixas e estáveis. Entretanto registros de elevação térmica na região da Baía do Almirantado, Península Antártica tem suscitado questionamentos a respeito dos efeitos fisiológicos desencadeados nos peixes antárticos. Por isso, esse trabalho teve como objetivo verificar se o estresse térmico (8°C) de curto prazo (de 2 a 144h) influencia os processos de produção de energia e promove o estresse oxidativo nos rins de *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps*. O rim apresenta importante papel para o suprimento energético de outros tecidos, principalmente frente ao estresse térmico. Para verificar os efeitos da temperatura no metabolismo energético foram utilizados como marcadores os parâmetros metabólicos como glicogênio, lactato e piruvato, e as enzimas hexoquinase (HK), fosfofrutoquinase (PFK), citrato sintase (CS), malato desidrogenase (MDH), lactato desidrogenase (LDH) e glicose-6-fosfatase (G6Pase). As enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona-S-transferase (GST), glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona redutase (GR) e glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), além dos conteúdos de glutathiona reduzida (GSH), malondialdeído (MDA) e carbonilação proteica (CP) foram avaliados para a inferência do status da defesa antioxidante. O metabolismo de carboidratos no rim de *N. rossii* foi alterado nas primeiras horas, sendo que em 2h as enzimas glicolíticas e do ciclo do ácido cítrico tendem a diminuir, e em 6h a aumentar, possivelmente refletindo um aumento na demanda por ATP. Após 12h os níveis de atividade das enzimas do metabolismo energético diminuíram e apresentaram valores semelhantes aos observados no grupo controle até o final do experimento, sugerindo que o equilíbrio entre a demanda de energia e a produção de ATP no tecido renal foi restaurado. Em *N. coriiceps*, embora a via glicolítica (HK) tenha sido afetada em 2 horas de exposição a 8°C, após este período o estresse térmico não afetou as vias de produção de energia no tecido renal. Provavelmente as reservas de glicogênio renais contribuíram para a manutenção da via glicolítica, corroborado pela flutuação temporal da G6Pase. Com relação à defesa antioxidante renal de *N. rossii*, as primeiras horas de estresse térmico resultaram na redução nas enzimas antioxidantes (CAT, GST, GPx e GR), contribuindo para o processo de lipoperoxidação. Enquanto, os rins de *N. coriiceps* não mostraram indícios de danos oxidativos em resposta ao aumento de temperatura. Dessa forma, observa-se que os parâmetros do metabolismo energético e do estresse oxidativo são afetados pelo estresse térmico de forma tempo- e espécie-dependentes.

Palavras-chave: *Notothenia*. Metabolismo energético. Estresse oxidativo. Temperatura. Baía do Almirantado.

Artigo referente ao presente capítulo:

Forgati, M.; Kandalski, P.K.; Herrerias, T.; Zaleski, T.; Machado, C.; De Souza, M.R.D.; Donatti, L. Effects of heat stress on the renal and branchial carbohydrate metabolism and antioxidant system of Antarctic fish. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 187, n. 8, p. 1137-1154, 2017. doi:10.1007/s00360-017-1088-3

## 1 INTRODUÇÃO

O aumento de aproximadamente 2°C em torno da Península Antártica, entre as latitudes 65° e 70°S, nas últimas décadas (KING; HARANGOZO, 1998; TURNER et al., 2005, 2014) tem suscitado questionamentos a respeito da plasticidade dos organismos endêmicos da região. Os peixes antárticos são considerados animais extremamente estenotérmicos, que experimentam temperaturas próximas ao ponto de congelamento da água do mar (-1,9°C) com flutuações térmicas anuais menores que 1°C (HUNT; HOEFLING; CHENG, 2003). Muitas espécies de peixes antárticos (por ex.: *Trematomus bernacchii*, *Trematomus hansonii* e *Trematomus pennelli*) não toleram elevações bruscas na temperatura (4°C) (ROBINSON, 2008) possivelmente devido à ocorrência de hipóxia induzida por aquecimento (PÖRTNER; MARK; BOCK, 2004; PÖRTNER, 2010). Contudo, trabalhos têm constatado maior plasticidade térmica da ictiofauna Antártica após períodos de aclimação (VAN DIJK et al., 1999; MARK, BOCK; PÖRTNER, 2002; LANNIG; STORCH; PÖRTNER, 2005; PODRABSKY; SOMERO, 2006; BILYK; DEVRIES, 2011; STROBEL et al., 2012; STROBEL et al., 2013).

A manutenção do metabolismo aeróbico é decisiva para a tolerância térmica de um organismo (PÖRTNER; LANGENBUCH; MICHAELIDIS, 2005; MINTENBECK et al., 2012). Portanto, quando o animal é submetido ao estresse térmico é necessário que haja uma estabilização das taxas metabólicas, garantindo o suprimento apropriado de oxigênio aos tecidos. A exposição a temperaturas diferentes das quais estão adaptados pode promover alterações compensatórias nos níveis das enzimas glicolíticas e mitocondriais (VAN DIJK et al., 1999), sendo que a participação relativa das vias metabólicas pode ser alterada de forma significativa (PÖRTNER, 2002). Diante disso, a avaliação dos níveis de atividade de enzimas-chave do metabolismo energético, bem como da concentração tecidual de intermediários do metabolismo, permite verificar de que forma o estresse térmico influencia os processos de produção de energia e de biossíntese de moléculas.

Os rins, juntamente com as brânquias e o intestino, apresentam importante papel na osmorregulação e excreção. O funcionamento adequado desse órgão requer a ação de numerosas enzimas e transportadores, cuja

síntese e atividade exigem grandes quantidades de energia (TSENG; HWANG, 2008). O tecido renal é responsável também pela produção hematopoiética, imunológica, hormonal (BARTON, 2002; MARSHALL; GROSSELL, 2006; ENGELUND; MADSEN, 2011) e apresenta importante papel na regulação metabólica e na manutenção do fornecimento de energia para outros tecidos, o que parece ser uma estratégia metabólica crítica frente ao estresse térmico.

O estresse térmico, além de alterações no metabolismo energético, pode promover uma geração aumentada de espécies reativas de oxigênio (EROs), devido a uma maior taxa metabólica (HOCHACHKA; SOMERO, 2002; BAGNYUKOVA; STOREY; LUSHCHAK, 2003), danificação de grupos heme (GIROTTI, 1998), ou indução da expressão de proteínas de desacoplamento que dissipam o gradiente protoiônico essencial para a fosforilação oxidativa (MARK; LUCASSEN; PÖRTNER, 2006). Quando ocorre um desequilíbrio entre a geração de EROs e a atividade do sistema antioxidante, o estado redox celular é alterado, podendo causar estresse oxidativo. O qual pode gerar lesões oxidativas em macromoléculas, como carbonilação de proteínas (CP), inativações enzimáticas, peroxidação lipídica (LPO) e danos ao DNA que comprometem as funções biológicas e podem levar à morte celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Os peixes antárticos apresentam vários mecanismos para lidar com as temperaturas congelantes e estáveis do oceano Antártico sendo que *N. rossii* e *N. coriiceps* apresentam rins aglomerulares, onde a urina é produzida pela secreção tubular e não pela ultrafiltração. Com isso, moléculas de baixo peso molecular, como as glicoproteínas anticongelantes (AFGPs) e alguns íons não são eliminados. Por isso, em condições fisiológicas normais, a manutenção do processo de regulação iônica, envolve um grande custo energético (TSENG; HUANG, 2008). Vale ressaltar que peixes antárticos quando comparados com peixes de ambientes temperados possuem mais íons sódio e cloreto em seu sangue (SMITH, 1972; O'GRADY; DEVRIES, 1982) o que permite que o ponto de congelamento do sangue seja ainda menor do que o ponto de congelamento da água do mar (JIN e DEVRIES, 2006; CULLINS *et al.*, 2011). Outras adaptações incluem, por exemplo, um elevado grau de insaturação lipídica, uma adaptação homeoviscosa para o transporte transmembrana facilitando a difusão de oxigênio a baixas temperaturas (ENZOR; PLACE, 2014) e uma elevada

densidade mitocondrial nos diferentes tecidos (WINDISCH et al., 2014). Essas adaptações favorecem uma maior exposição dos tecidos ao oxigênio, com consequente aumento da geração de EROs. Por isso, vários estudos relatam que o sistema antioxidante de peixes antárticos é robusto e mais eficiente que o apresentado por peixes tropicais e temperados, e que, apesar da produção aumentada de EROs, não são tão suscetíveis aos danos oxidativos (ABELE; PUNTARULO, 2004; GRIM et al., 2013). Já que estes são atenuados por uma série de enzimas antioxidantes e substâncias não enzimáticas que se apresentam em níveis constitutivos elevados. Por exemplo, os peixes antárticos, *Pagothenia borchgrevinki* e *T. bernachii*, apresentam de 5 a 6 vezes maiores níveis de tocoferol, em relação às espécies temperadas *Parapercis colias* e *Notolabrus fucicola* (GIESEG et al., 2000). Outros estudos sugerem que os nototenídeos devem ter perdido a habilidade de elevar os níveis de antioxidantes em resposta ao estresse térmico (MUELLER et al., 2012).

*Notothenia rossii* (Richardson, 1844) e *Notothenia coriiceps* (Richardson, 1844) são ecológica (RAGA et al., 2015) e filogeneticamente (NEAR; PESAVENTO; CHENG, 2004) similares. Entretanto, as duas espécies apresentam diferentes adaptações à coluna d'água, e essas diferenças refletem as diferenças morfológicas e comportamentais. *N. rossii* é semipelágico e migratório (BURCHETT, 1983; KNOX, 1994) e se alimenta de presas bênticas na coluna d'água durante os meses de verão (BARRERA-ORO, 2002; CAMPBELL et al., 2008). *N. coriiceps* é demersal e sedentário, alimenta-se de organismos bênticos e apresenta mecanismo de dormência e supressão metabólica durante o inverno (CAMPBELL et al., 2008). Essas espécies são abundantes e representam um importante elo da cadeia alimentar (CORBISIER et al., 2004) na Baía do Almirantado na Península Antártica e são organismos modelo da fauna desta região (RODRIGUES et al., 2011; RODRIGUES JUNIOR et al., 2013; MACHADO et al., 2014; RAGA et al., 2015; RODRIGUES JUNIOR et al., 2015; FORGATI et al., 2017; SOUZA et al., 2018). Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do estresse térmico (8°C) de curto prazo (2-144h) no metabolismo energético de carboidratos e na defesa antioxidante renal dos nototenídeos antárticos *N. rossii* e *N. coriiceps*.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Avaliar as respostas do metabolismo energético de carboidratos e da defesa antioxidante renal de *N. rossii* e de *N. coriiceps* submetidos ao estresse térmico (8°C) por curto prazo (2 a 144h).

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Mensurar as variações dos intermediários metabólicos renais como o glicogênio, lactato e piruvato em *N. rossii* e *N. coriiceps*, submetidos ao estresse térmico (8°C) por curto prazo (2 a 144h).
- Avaliar as variações na atividade de enzimas renais relacionadas ao metabolismo energético de carboidratos, através de análises da atividade da hexoquinase (HK), fosfofrutoquinase (PFK), citrato sintase (CS), malato desidrogenase (MDH), lactato desidrogenase (LDH) e glicose-6-fosfatase (G6Pase), em *N. rossii* e *N. coriiceps* submetidos ao estresse térmico (8°C) por curto prazo (2 a 144h).
- Avaliar as variações na atividade das enzimas renais antioxidantes através de análise da atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase (GR) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), em *N. rossii* e *N. coriiceps* submetidos ao estresse térmico (8°C) por curto prazo (2 a 144h).
- Analisar as variações nas concentrações renais de glutathione reduzida (GSH), lipoperóxidos (LPO) e carbonilação de proteínas (CP), em *N. rossii* e *N. coriiceps* submetidos ao estresse térmico (8°C) por curto prazo (2 a 144h).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 DECLARAÇÃO DE ÉTICA

Todo o trabalho foi executado de acordo com a ética e regras das leis brasileiras e do Tratado Antártico. O Ministério do Meio Ambiente concedeu a licença ambiental e o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Paraná (CEUA - UFPR) sob o nº 496/2010 e 840/2015.

#### 3.2 COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS E ARRANJO EXPERIMENTAL

Exemplares de *N. rossii* e *N. coriiceps* foram capturados com linha e anzol em profundidades entre 10 e 25 m em dois pontos da Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Ilhas Shetland do Sul, Península Antártica: Punta Plaza (62°05'64.5" S; 58°24'31.7"W) e Glaciar Ecology (62°10'65"S; 58°26'5 W). Após a coleta, *N. coriiceps* ( $n = 116$ ; comprimento total (CT) =  $38 \pm 4$  cm; peso =  $778 \pm 243$  g) e *N. rossii* ( $n = 118$ ; CT =  $34 \pm 3$  cm; peso =  $443 \pm 134$  g) foram colocados em tanques-controle de 1000 litros no laboratório de triagem da Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF). Onde foram mantidos com aeração constante, fotoperíodo de 12 h luz/ 12 h escuro, temperatura entre -0.5 e 1.0°C e salinidade de  $35 \pm 1.0$  psu por 3 dias a fim de permitir a recuperação de qualquer estresse causado pela captura e transporte. Após este período os animais foram aclimatados por 3 dias nos laboratórios experimentais (RYAN, 1995; MACHADO et al., 2014) sob as mesmas condições abióticas que as do laboratório de triagem, entretanto com um controle mais rigoroso da temperatura ( $0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ). Após a aclimação os peixes foram selecionados aleatoriamente, marcados com linhas coloridas na nadadeira dorsal, e diretamente transferidos para tanques de 1000 litros contendo água do mar com temperatura a  $8 \pm 0,5^\circ\text{C}$  (experimental) ou a  $0 \pm 0,5^\circ\text{C}$  (controle) por 2, 6, 12, 24, 72 ou 144 horas. De modo geral, cada grupo consistia em 10 animais ( $n = 5$ / tanque), contudo para os grupos de  $0^\circ\text{C}$ , 12 h e  $8^\circ\text{C}$ , 6 h de *N. rossii* e de  $0^\circ\text{C}$ , 2, 6, 12 h e  $8^\circ\text{C}$ , 6 h de *N. coriiceps* foram utilizados 9 animais.

A cada dois dias os tanques eram limpos e tinham 50% da água renovada com água do mar obtida a partir de uma profundidade de 4 m na frente da EACF. A temperatura da água foi previamente aquecida a 8°C (termostato Aquaterm 08 – Full Gauge®) antes de ser bombeada nos tanques. Os peixes foram alimentados individualmente dia sim, dia não (JAYASUNDARA; HEALY; SOMERO, 2013; CARNEY ALMROTH et al., 2015; RODRIGUES JUNIOR et al., 2015) com aproximadamente 2 g de músculo de peixe antártico ligado a um fio rígido longo (RODRIGUES JUNIOR et al., 2015). Os animais foram observados para determinar se a regurgitação do alimento ocorreu (DONATTI; FANTA, 2002). Os peixes que não se alimentaram foram excluídos dos experimentos. Para todos os grupos, o primeiro dia de aclimação foi o primeiro dia do fornecimento de alimentos. Os grupos experimentais (por exemplo, 8°C - 2 h) e os respectivos grupos controle (por exemplo, 0°C - 2 h) foram alimentados e eutanasiados no mesmo período.

Ao fim de cada experimento, os peixes foram anestesiados com benzocaína 1% (p v<sup>-1</sup>), eutanasiados com secção medular e imediatamente dissecados. Amostras de rim médio-posterior foram congeladas em nitrogênio líquido, mantidas em freezer a -80°C e processadas no Laboratório de Biologia Adaptativa – Departamento de Biologia Celular – UFPR.

### 3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

#### 3.3.1 Determinação dos intermediários metabólicos renais

A concentração de glicogênio renal foi determinada através do método de Dubois et al. (1956), modificado por Bidinoto, Moraes e Souza (1997). Amostras de tecido renal (100 mg) foram dissolvidas em KCN 6N em banho-maria fervente por 3 minutos, posteriormente adicionou-se etanol e K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 10%. Centrifugou-se as amostras a 2.000 x g por 3 minutos, descartando-se o sobrenadante e ressuspendendo o precipitado em água destilada, seguido por adição de fenol 4,1%, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. A concentração de glicogênio foi determinada em espectrofotômetro a 480 nm, utilizando uma solução padrão de glicose. Os resultados foram expressos como µmoles de glicosil-glicose/g de tecido.

A concentração de lactato renal foi determinada através da formação de um complexo entre o lactato e o sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ). Em tubo de ensaio foi adicionada à amostra desproteinizada (sobrenadante tecido renal), 20  $\mu\text{l}$  de  $\text{CuSO}_4$  4% e 3,5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . A solução foi então fervida durante 5 minutos, e após o resfriamento foi adicionado lentamente 80  $\mu\text{l}$  de solução de *p*-fenilfenol e agitado em vórtex. Após 1 hora em descanso foi efetuada nova fervura de 90 segundos, imediatamente resfriados em banho de água e a leitura foi realizada em 570 nm. Para determinação da concentração de lactato na amostra foi utilizado um padrão de lactato. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de lactato por g de tecido (HARROWER; BROWN, 1972).

A concentração do piruvato renal foi determinada pela metodologia de Lu (1939) que consiste na reação da dinitrofenilhidrazina (DNPH). A amostra desproteinizada (sobrenadante do tecido renal) mais o DNPH 0,1% (HCl 2 N) foram mantidos a 37°C por 30 minutos. Após esse período, foi adicionado NaOH 1,3N. A leitura ocorreu em espectrofotômetro em 440 nm. A concentração de piruvato foi determinada contra um padrão de piruvato de sódio e expressa em mmol por g de tecido.

### 3.3.2 Determinação da atividade das enzimas do metabolismo energético de carboidratos renal

As amostras de rim médio-posterior foram pesadas e homogeneizadas com o auxílio do homogeneizador motorizado Potter-Elvehjem. Em seguida, o homogeneizado foi sonificado durante 15 segundos para ruptura de estruturas subcelulares, como retículo endoplasmático e mitocôndria. A seguir o homogeneizado foi centrifugado em 14.000g a 4°C durante 10 min e o sobrenadante foi utilizado para as determinações da atividade enzimática.

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovina (BSA) como padrão. A leitura foi obtida em leitora de microplaca EPOCH (EPOCH Microplate Spectrophotometer, BioTek, Winooski, VT, USA) a 595 nm. Os resultados foram utilizados para normalizar os dados da atividade enzimática em 1 mg de proteína por ml de solução.

A velocidade da reação das enzimas analisadas foi expressa em Unidade Internacional (U), onde uma U é a quantidade de enzima capaz de consumir 1  $\mu\text{mol}$  ou formar 1  $\mu\text{mol}$  de produto por minuto por miligrama de proteína (U/mg de proteína).

Os ensaios da HK, PFK, CS, MDH e LDH foram realizados em triplicata, em microplaca de 384 poços, enquanto que para a avaliação da atividade da G6Pase foram obtidas duplicatas, em microplacas de 96 poços.

A atividade da HK foi avaliada em 50 mM de tampão Imidazol (pH 7,4), contendo 2,0 mM de glicose, 2,0 mM de ATP, 10,0 mM de cloreto de magnésio, 0,4 mM de  $\text{NADP}^+$ , 1,0 mM de ditioneitol, 2,0 mM de cloreto de potássio e 0,3 U/mL de glicose-6-fosfato desidrogenase. A variação de absorbância foi obtida em espectrofotômetro a 340nm (BALDWIN et al., 2007).

A atividade da PFK foi determinada em meio de reação contendo tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,2), cloreto de magnésio 10mM, ATP 1 mM, NADH 0,15 mM, AMP 2 mM, cloreto de potássio 250 mM, 1 U/mL de glicerolfosfato desidrogenase, 1,2 U/mL de aldolase, 10 U/mL de triose fosfato isomerase e frutose-6-fosfato 5,0 mM. A variação de absorbância foi acompanhada espectrofotometricamente em 340nm (BALDWIN et al., 2007).

A atividade da CS foi determinada segundo o método descrito por Saborowski e Buchholz (2002), onde a reação é iniciada pela adição de oxaloacetato ao meio. O meio de reação foi composto por tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), cloreto de potássio 100mM, EDTA 1 mM, 5,5'- Ditione-bis-(ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) 0,2 mM, acetil Coenzima A 0,2 mM e oxaloacetato 0,5 mM. O método baseia-se na condensação do oxaloacetato e do acetil-coenzima A, em reação catalisada pela CS, formando citrato e coenzima A (CoA). A reação entre DTNB e o grupo tiol da CoA resulta na formação de complexo que absorve luz em 410 nm.

A atividade da MDH foi determinada segundo o método proposto por Childress e Somero (1979). O sistema de reação foi composto de tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), oxaloacetato 0,4 mM, cloreto de magnésio 20 mM, NADH 0,155 mM. Nas condições do ensaio, a MDH catalisa a conversão do oxaloacetato em malato. A atividade catalítica é determinada a partir da velocidade de desaparecimento do NADH. Determina-se o decréscimo da absorbância em 340 nm.

A atividade da LDH foi determinada com o sistema de reação composto de tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), piruvato de sódio 1 mM, cloreto de potássio 100 mM,  $\beta$ -Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH) 0,254 mM. A reação baseia-se na redução do piruvato em lactato sendo avaliada espectrofotometricamente a velocidade de desaparecimento do NADH medido em 340 nm (THUESEN; MCCULLOUGH; CHILDRESS, 2005).

A atividade da G6Pase foi determinada pelo método descontínuo descrito por Fathi et al. (2002). O meio de reação foi composto por tampão Imidazol 100 mM (pH 7,4), EDTA 1,8 mM, glicose-6-fosfato 26,5 mM. Ao adicionar-se o reativo verde de malachita (molibdato de amônia, verde de malachita e Tween) a reação é interrompida. O fosfato inorgânico formado na reação foi quantificado espectrofotometricamente em 600 nm.

### 3.3.3 Determinação da atividade das enzimas do sistema de defesa antioxidante renal

Para a determinação das enzimas antioxidantes, após as amostras serem homogeneizadas, estas foram centrifugadas a 12000 g a 4°C por 20 minutos e o sobrenadante aliquoteado.

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovina (BSA) como padrão. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína. Onde 1 unidade de SOD equivale a atividade capaz de inibir a redução do NBT em 50%. Uma unidade de CAT e de GST é definida como a quantidade de enzima capaz de consumir 1  $\mu$ mol de substrato ou formar 1  $\mu$ mol de produto por minuto por miligrama de proteína (U/mg de proteína).

Os ensaios da SOD, GST, GPx, GR e G6PDH foram realizados em triplicata, em microplaca de 384 poços, enquanto que para a análise da CAT, foi utilizada cubeta de quartzo, obtendo-se duplicatas de cada amostra.

A atividade da SOD foi determinada de acordo com o método de Crouch, Gandy e Kinsey (1981). O sistema de reação é constituído por tampão carbonato de sódio 100 mM (pH 10,2), EDTA 17,5  $\mu$ M e 1 mM de NBT (cloreto de azul de nitrotetrazólio). A reação iniciou com a adição de hidroxilamina (37 mM), a qual tem o potencial gerador do superóxido que é capaz de reduzir o NBT presente.

A atividade da SOD inibe a redução do NBT. Essa inibição foi acompanhada através do aumento de absorbância em 560 nm.

A atividade da CAT foi determinada em meio de reação contendo 50mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,0) e peróxido de hidrogênio a 10 mM. A redução da absorbância foi acompanhada em 240 nm (BEUTLER, 1975).

A atividade da GST foi avaliada após a conjugação do grupo tiol da glutathiona reduzida (GSH) ao substrato de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), onde forma-se como produto da reação, o conjugado GS-DNB, o qual foi mensurado espectrofotometricamente em 340 nm. A taxa de aumento da absorção é diretamente proporcional à atividade de GST (KEEN; HABIG; JAKOBY, 1976 com modificações).

A atividade da GPx foi acompanhada espectrofotometricamente através da oxidação de NADPH a 340nm. No meio de reação composto por tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 7,0), a enzima utiliza glutathiona reduzida (GSH a 2 mM) para reduzir um peróxido orgânico originando glutathiona dissulfídica (GSSG). Esta última é reduzida pela enzima glutathiona redutase (GR a 1 U/ml) utilizando elétrons doados pelo NADPH (0,2 mM) (WENDEL, 1981).

A atividade da GR foi mensurada em meio de reação composto por tampão fosfato de potássio (100mM, pH 7,0), EDTA 1mM, NADPH 0,1 mM e glutathiona oxidada 1mM. Onde através da oxidação do NADPH com a concomitante redução da glutathiona dissulfídica (GSSG) foi acompanhado o decréscimo da absorbância em 340nm (CARLBERG; MANNERVIK, 1975).

A atividade da G6PDH foi determinada em meio de reação contendo tampão Tris-HCl 100 mM (pH 7,4), glicose-6-fosfato 1 Mm e NADP<sup>+</sup> 0,2 mM. O princípio do método baseia-se na reação de oxidação de glicose-6-fosfato catalisada pela G6PDH, com a formação de NADPH<sup>+</sup>H<sup>+</sup>, que pode ser acompanhada em 340 nm (CIARDELLO; CAMARDELLA; DI PRISCO, 1995).

#### 3.3.4 Determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH) e marcadores de danos oxidativos renais

Os níveis de glutathiona e outros tióis foram determinados através da precipitação de proteínas e posterior reação de tióis não proteicos com o DTNB gerando produto que absorve luz a 415nm (SEDILAK; LINDSAY, 1968).

Para a determinação da LPO e da PCO, depois de homogeneizadas, as amostras foram centrifugadas a 12.000g a 4°C por 20 minutos. A LPO foi estimada pela quantificação dos produtos finais da peroxidação lipídica, dentre eles o malondialdeído (MDA), pelo método de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) utilizando malondialdeído-(bis)-acetato (MDA, Merck, Darmstadt, Germany) como padrão (FEDERICI; SHAW; HANDY, 2007 com modificações). A mistura foi incubada a 60°C por 60 minutos, em meio ácido. A reação de MDA com o TBA (ácido tiobarbitúrico) forma um produto rosa que pode ser medido espectrofotometricamente a 535 nm. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mols}$  de MDA por grama de massa úmida (FEDERICI; SHAW; HANDY, 2007 com modificações).

O dano oxidativo em proteínas foi determinado pela medida de grupos carbonil conforme previamente descrito por Levine et al. (1994). As amostras obtidas foram precipitadas e as proteínas dissolvidas com dinitrofenilidrazina. Os grupamentos carbonil foram mensurados pela absorbância em 370 nm.

### 3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As mudanças ao longo do tempo foram testadas para um nível de significância de 5% mediante análise de variância de duas vias (ANOVA), no qual o tempo de exposição (2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas) e a temperatura (0 e 8°C) foram os fatores analisados, seguido do pós-teste de Tukey para a comparação das médias. O teste de Levene foi utilizado *a priori* para testar a homogeneidade das variâncias.

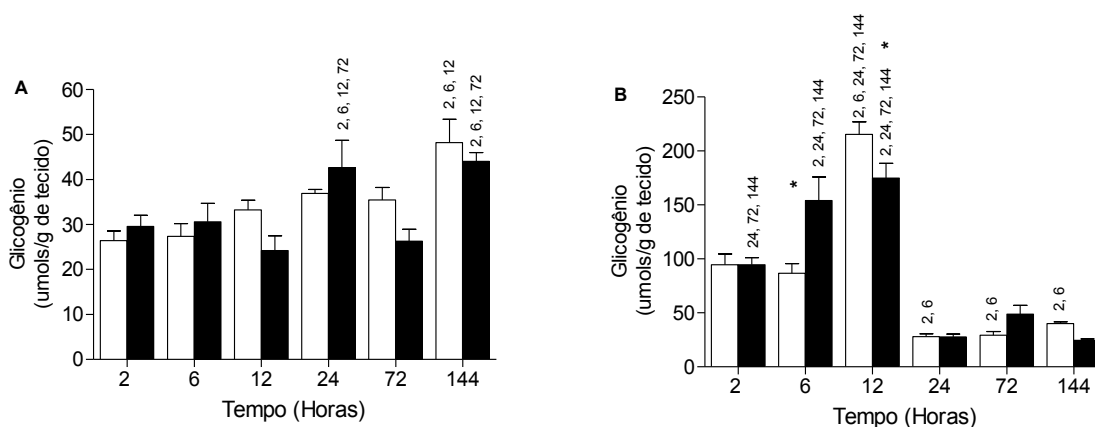


## 4 RESULTADOS

### 4.1 EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO NA CONCENTRAÇÃO DOS INTERMEDIÁRIOS METABÓLICOS RENAIIS

Em *N. rossii*, a concentração de glicogênio não foi alterada frente a elevação térmica a 8°C (Figura 1A). Entretanto, ao longo do tempo, em 8°C houve aumento do glicogênio em 24 e 144 horas em relação aos demais tempos. Em *N. coriiceps* (Figura 1B), observou-se o aumento da concentração de glicogênio a 8°C em 6 horas e o decréscimo em 12 horas. Ao longo do tempo na temperatura de 0°C, as maiores concentrações de glicogênio ocorreram em 12 horas, enquanto que a partir de 24 horas nota-se um declínio acentuado em relação às 12 horas iniciais. Já em 8°C, houve aumento crescente do glicogênio renal nas primeiras 24 horas, encontrando-se os menores níveis em 24, 72 e 144 horas (Tabelas 1 e 2).

FIGURA 1 - CONCENTRAÇÕES DE GLICOGÊNIO NOS RINS DE *Notothenia rossii* E *Notothenia coriiceps* SOB ESTRESSE TÉRMICO

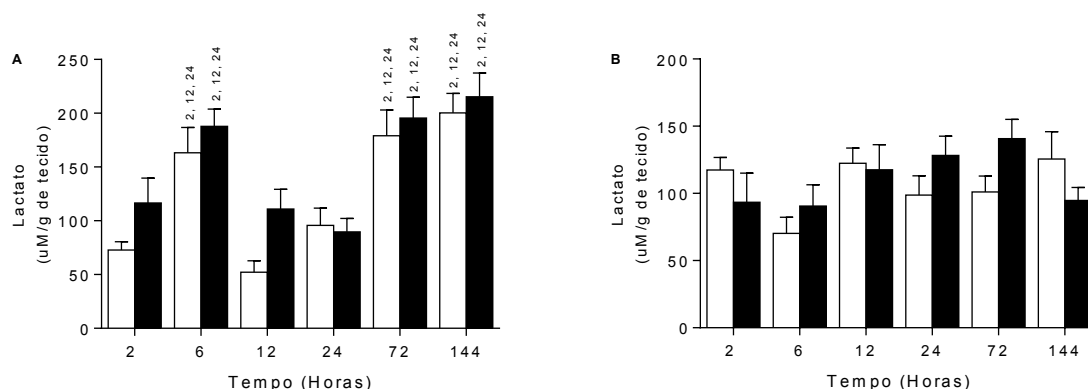


LEGENDA: A) *Notothenia rossii* e B) *Notothenia coriiceps*, expostos a 0°C e 8°C (barra branca e barra preta, respectivamente) durante 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas. Os asteriscos indicam diferenças significativas (teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ ) entre as temperaturas. Os números acima das barras indicam diferenças entre os tempos de exposição em 0°C e 8°C. Os dados estão expressos como média + EPM (erro padrão da média).

A concentração de lactato em ambas as espécies não foi alterada pelo aumento da temperatura. Em *N. rossii*, as maiores concentrações de lactato foram observadas em 6, 72 e 144 horas em relação a 2, 12 e 24 horas (Figura

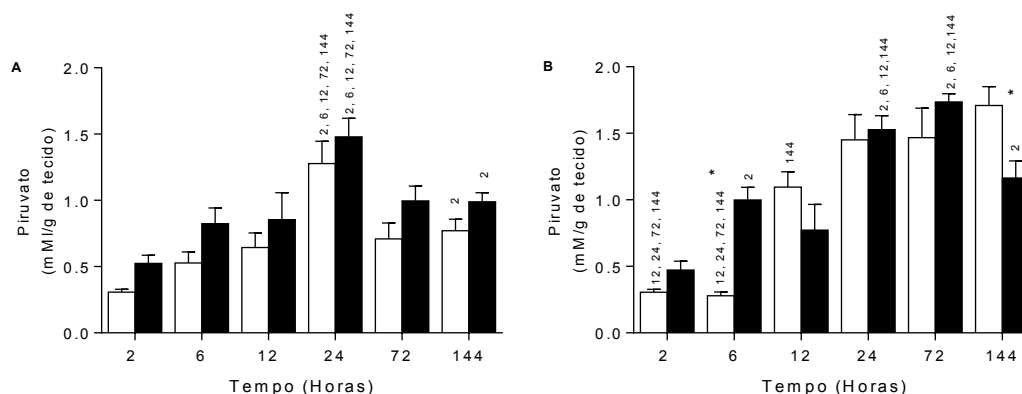
2A). Enquanto que em *N. coriiceps* não ocorreu alteração da concentração de lactato ao longo do tempo (Figura 2B e Tabelas 1 e 2).

FIGURA 2 - CONCENTRAÇÕES DE LACTATO NOS RINS DE *Notothenia rossii* E *Notothenia coriiceps* SOB ESTRESSE TÉRMICO



LEGENDA: A) *Notothenia rossii* e B) *Notothenia coriiceps*, expostos a 0°C e 8°C (barra branca e barra preta, respectivamente) durante 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as temperaturas (teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ ). Os números acima das barras indicam diferenças entre os tempos de exposição em 0°C e 8°C. Os dados estão expressos como média + EPM (erro padrão da média).

As concentrações de piruvato não foram alteradas em decorrência da elevação térmica em *N. rossii* (Figura 3A). Ao longo do tempo, houve maior concentração em 24 horas em relação aos demais tempos experimentais, tanto em 0°C quanto em 8°C. Em *N. coriiceps* (Figura 3B) houve aumento da concentração de piruvato a 8°C em 6 horas e decréscimo em 144 horas. Em 0°C, 2 e 6 horas, foram as menores concentrações de piruvato encontradas em comparação aos tempos posteriores. Ainda em 0°C, em 12 horas há menores concentrações de piruvato em relação a 144 horas. Em 8°C, as maiores concentrações de piruvato foram em 24 e 72 horas em relação a 2, 6, 12 e 144 horas, sendo que em 2 horas observaram-se os menores níveis de piruvato quando comparado com 6, 24, 72 e 144 horas (Tabelas 1 e 2).

FIGURA 3 - CONCENTRAÇÕES DE PIRUVATO NOS RINS DE *Notothenia rossii* E *Notothenia coriiceps* SOB ESTRESSE TÉRMICO

LEGENDA: A) *Notothenia rossii* e B) *Notothenia coriiceps*, expostos a 0°C e 8°C (barra branca e barra preta, respectivamente) durante 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as temperaturas (teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ ). Os números acima das barras indicam diferenças entre os tempos de exposição em 0°C e 8°C. Os dados estão expressos como média + EPM (erro padrão da média).

TABELA 1 - RESULTADOS DO TESTE DE ANOVA (DUAS-VIAS) PARA OS INTERMEDIÁRIOS METABÓLICOS RENAIIS DE *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps*

<i>Notothenia rossii</i>				<i>Notothenia coriiceps</i>			
		Temperatura	Tempo	TE x Ti	Temperatura	Tempo	TE x Ti
<b>Glicogênio</b>	F	0,80	8,86	1,77	0,93	101,19	7,85
	p	0,37	<0,01*	0,12	0,34	<0,01*	<0,01*
<b>Lactato</b>	F	5,40	18,09	0,85	0,79	1,88	1,56
	p	0,02*	<0,01*	0,52	0,38	0,11	0,18
<b>Piruvato</b>	F	11,93	13,89	0,04	1,50	29,76	5,63
	p	<0,01*	<0,01*	0,99	0,22	<0,01*	<0,01*

LEGENDA: Temperatura (TE) (0° e 8°C) e tempo de exposição (Ti) (2, 6, 12, 24, 72, 144 horas). Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as temperaturas (teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ ).

TABELA 2 - VALORES MÉDIO ± ERRO-PADRÃO DA MÉDIA DOS INTERMEDIÁRIOS METABÓLICOS RENAIIS DE *Notothenia rossii* E *Notothenia coriiceps*

Sp	Parâm	T °C	2h	6h	12h	24h	72h	144h
NR	<b>Glicog</b>	0	26,43 ± 2,13 <sup>a</sup>	27,37 ± 2,84 <sup>a</sup>	33,22 ± 2,17 <sup>a</sup>	36,91 ± 0,94 <sup>ab</sup>	35,47 ± 2,74 <sup>ab</sup>	48,23 ± 5,20 <sup>b</sup>
		8	29,58 ± 2,51 <sup>a</sup>	30,63 ± 4,11 <sup>a</sup>	24,23 ± 3,30 <sup>a</sup>	42,67 ± 6,03 <sup>b</sup>	26,28 ± 2,69 <sup>a</sup>	44,04 ± 1,92 <sup>b</sup>
	<b>Lact</b>	0	72,73 ± 7,81 <sup>a</sup>	184,22 ± 29,61 <sup>b</sup>	52,22 ± 10,54 <sup>a</sup>	95,77 ± 16,05 <sup>a</sup>	179,11 ± 23,94 <sup>b</sup>	200,31 ± 18,20 <sup>b</sup>
		8	116,61 ± 23,01 <sup>a</sup>	187,86 ± 16,06 <sup>b</sup>	110,84 ± 18,37 <sup>a</sup>	89,60 ± 12,61 <sup>a</sup>	195,42 ± 19,55 <sup>b</sup>	215,35 ± 22,09 <sup>b</sup>
	<b>Piruv</b>	0	0,31 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,53 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,64 ± 0,11 <sup>a</sup>	1,28 ± 0,17 <sup>b</sup>	0,71 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,77 ± 0,09 <sup>c</sup>
		8	0,52 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,82 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,85 ± 0,20 <sup>a</sup>	1,48 ± 0,14 <sup>b</sup>	0,99 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,99 ± 0,07 <sup>c</sup>
NC	<b>Glicog</b>	0	94,48 ± 9,09 <sup>a</sup>	86,70 ± 8,80 <sup>a</sup>	215,27 ± 11,50 <sup>b</sup>	28,07 ± 2,40 <sup>c</sup>	29,17 ± 3,58 <sup>c</sup>	40,17 ± 1,50 <sup>c</sup>
		8	94,40 ± 6,38 <sup>a</sup>	154,02 ± 21,80 <sup>b*</sup>	192,67 ± 19,90 <sup>b*</sup>	27,67 ± 2,58 <sup>c</sup>	48,80 ± 8,08 <sup>c</sup>	24,70 ± 1,30 <sup>c</sup>
	<b>Lact</b>	0	117,48 ± 9,32	70,19 ± 12,14	122,39 ± 11,43	98,68 ± 14,42	101,03 ± 11,97	125,65 ± 20,33
		8	125,90 ± 27,15	90,52 ± 15,93	164,42 ± 39,59	128,20 ± 14,42	140,79 ± 14,27	94,72 ± 9,62
	<b>Piruv</b>	0	0,31 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,28 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,10 ± 0,12 <sup>b</sup>	1,45 ± 0,19 <sup>b</sup>	1,47 ± 0,22 <sup>b</sup>	1,71 ± 0,14 <sup>b</sup>
		8	0,44 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,99 ± 0,10 <sup>b*</sup>	0,77 ± 0,19 <sup>ab</sup>	1,53 ± 0,11 <sup>c</sup>	1,74 ± 0,06 <sup>c</sup>	1,16 ± 0,13 <sup>bc*</sup>

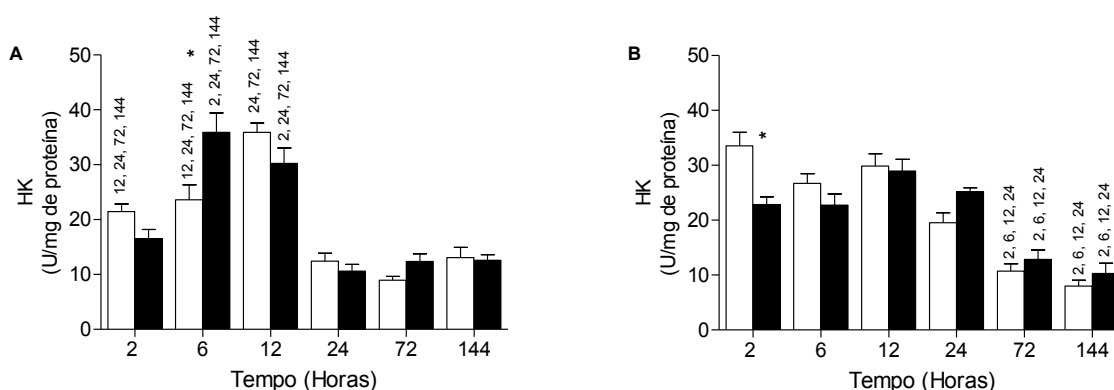
LEGENDA: Animais expostos a 0°C (controle) e 8°C (experimentais) durante 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas. Glicogênio e lactato expressos em  $\mu\text{mol/g}$  de tecido; piruvato expresso em  $\text{mmol/g}$

de tecido. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as temperaturas (teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ ). As letras diferentes indicam diferenças entre os tempos de exposição em 0°C e 8°C. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média).

#### 4.2 EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO NOS NÍVEIS DE ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS RENAL

Os níveis de atividade da HK em *N. rossii* (Figura 4A) aumentaram em 8°C em relação a 0°C em 6 horas de exposição. Ao longo do tempo, em 0°C observou-se o pico da atividade da HK em 12 horas em relação aos demais tempos. Em 8°C, os maiores níveis de atividade ocorreram em 6 e 12 horas em comparação aos outros tempos analisados. Em *N. coriiceps* (Figura 4B), a atividade da HK foi menor em 8°C em 2 horas. Ao longo do tempo, em 0°C e 8°C houve redução da atividade da HK em 72 e 144 horas quando comparado com 2, 6, 12 e 24 horas (Tabelas 3 e 4).

FIGURA 4 – NÍVEIS DE ATIVIDADE DA HEXOKINASE (HK) NOS RINS DE *Notothenia rossii* E *Notothenia coriiceps* SOB ESTRESSE TÉRMICO

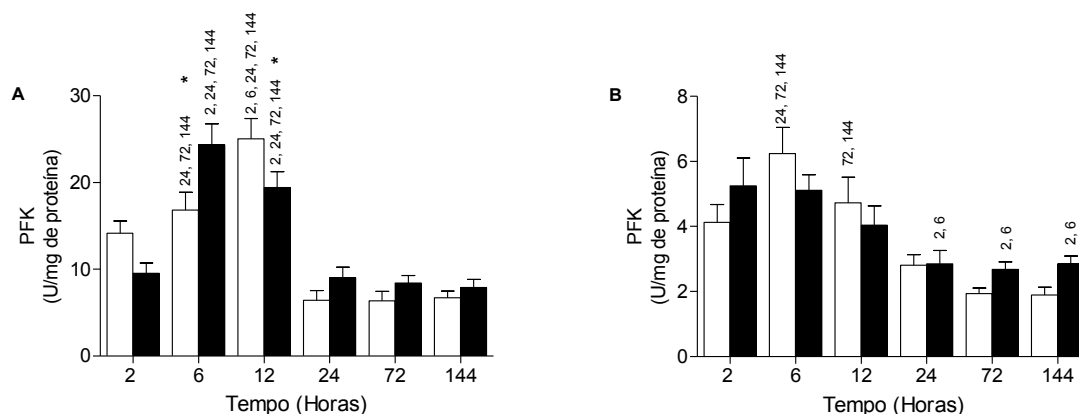


LEGENDA: A) *Notothenia rossii* e B) *Notothenia coriiceps*, expostos a 0°C e 8°C (barra branca e barra preta, respectivamente) durante 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as temperaturas (teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ ). Os números acima das barras indicam diferenças entre os tempos de exposição em 0°C e 8°C. Atividades expressas em U/mg de proteína. Os dados estão expressos como média + EPM (erro padrão da média).

Em *N. rossii* (Figura 5A), em 6 horas de experimento, a atividade da PFK mostrou-se maior em 8°C quando comparada ao controle, enquanto que em 12 horas houve redução. Ao longo do tempo de exposição, observou-se que em 0°C ocorreu aumento gradativo da PFK até 12 horas, havendo redução significativa a partir de 24 horas. Já, em 8°C houve aumento em 6 e 12 horas quando comparado a 2, 24, 72 e 144 horas. A PFK (Figura 5B) em *N. coriiceps* não

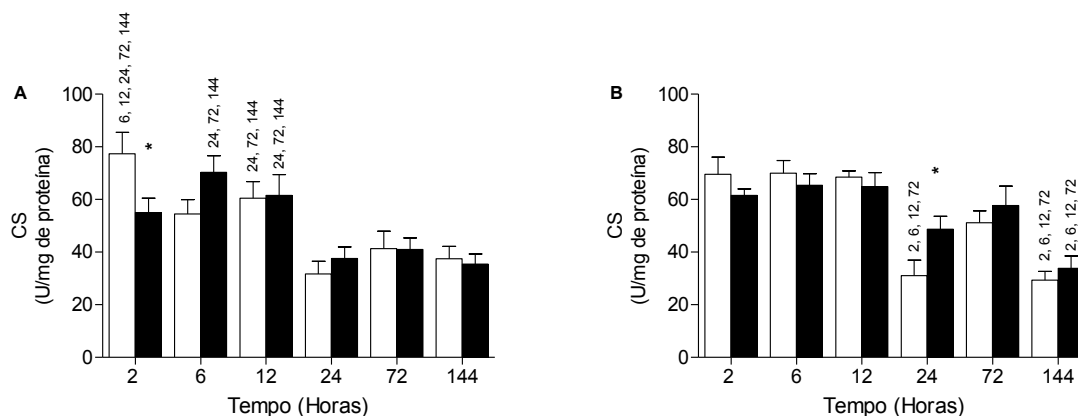
apresentou alterações estatísticas significativas frente a elevação térmica. Ao longo do tempo, nos peixes mantidos a 0°C, os níveis de atividade da PFK foram maiores em 6 horas em comparação com 24, 72 e 144 horas e em 12 horas em relação a 72 e 144 horas. Enquanto que em 8°C observou-se um declínio da PFK em 24, 72 e 144 horas em relação aos tempos experimentais de 2 e 6 horas (Tabelas 3 e 4).

FIGURA 5 – NÍVEIS DE ATIVIDADE DA FOSFOFRUTOQUINASE (PFK) NOS RINS DE *Notothenia rossii* E *Notothenia coriiceps* SOB ESTRESSE TÉRMICO



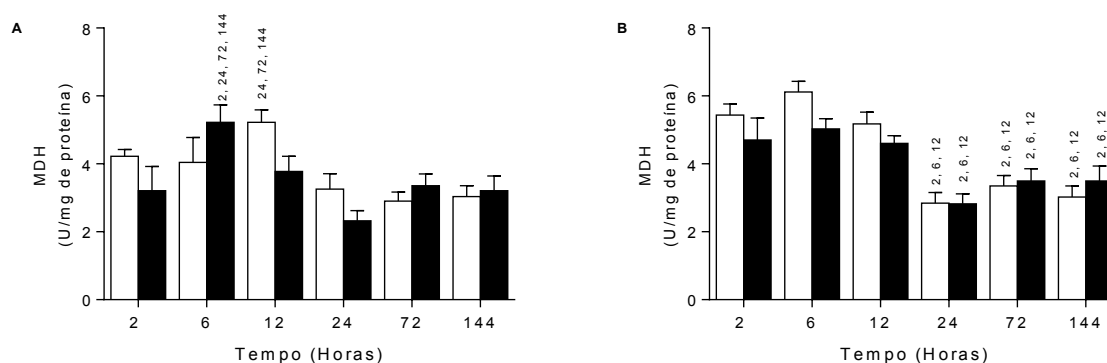
LEGENDA: A) *Notothenia rossii* e B) *Notothenia coriiceps*, expostos a 0°C e 8°C (barra branca e barra preta, respectivamente) durante 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as temperaturas (teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ ). Os números acima das barras indicam diferenças entre os tempos de exposição em 0°C e 8°C. Atividades expressas em U/mg de proteína. Os dados estão expressos como média + EPM (erro padrão da média).

Em *N. rossii* houve redução dos níveis de atividade da CS nos peixes expostos a 8°C por 2 horas quando comparado com 0°C. Ao longo do tempo, em 0°C, houve maior atividade em 2h em relação aos demais tempos experimentais. Em 8°C, houve maior atividade da CS em 6 e 12 horas em relação a 24, 72 e 144 horas (Figura 6A). Em *N. coriiceps*, os níveis de atividade da CS foram maiores na temperatura de 8°C em relação a 0°C em 24 horas de exposição. Em 0°C, constatou-se a redução dos níveis de atividade da CS em 24 e 144 horas em relação a 2, 6, 12 e 72 horas. Enquanto que em 8°C observou-se a redução dos níveis de atividade da CS em 144 horas em relação a 2, 6, 12 e 72 horas (Figura 6B e Tabelas 3 e 4).

FIGURA 6 – NÍVEIS DE ATIVIDADE DA CITRATO SINTASE (CS) NOS RINS DE *Notothenia rossii* E *Notothenia coriiceps* SOB ESTRESSE TÉRMICO

LEGENDA: A) *Notothenia rossii* e B) *Notothenia coriiceps*, expostos a 0°C e 8°C (barra branca e barra preta, respectivamente) durante 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as temperaturas (teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ ). Os números acima das barras indicam diferenças entre os tempos de exposição em 0°C e 8°C. Atividades expressas em U/mg de proteína. Os dados estão expressos como média + EPM (erro padrão da média).

O aquecimento a 8°C não alterou os níveis de atividade da MDH em relação a 0°C nas duas espécies analisadas (Figuras 7A e 7B), mas apresentaram diferenças ao longo dos tempos de exposição. Em *N. rossii*, a 0°C, os níveis de atividade da MDH foram maiores em 12 horas em relação a 24, 72 e 144 horas, enquanto que em 8°C os maiores níveis ocorreram em 6 horas quando comparado com 2, 24, 72 e 144 horas. Em *N. coriiceps*, a 0°C e 8°C, os níveis de atividade da MDH foram menores em 24, 72 e 144 horas em relação aos tempos iniciais (Tabelas 3 e 4).

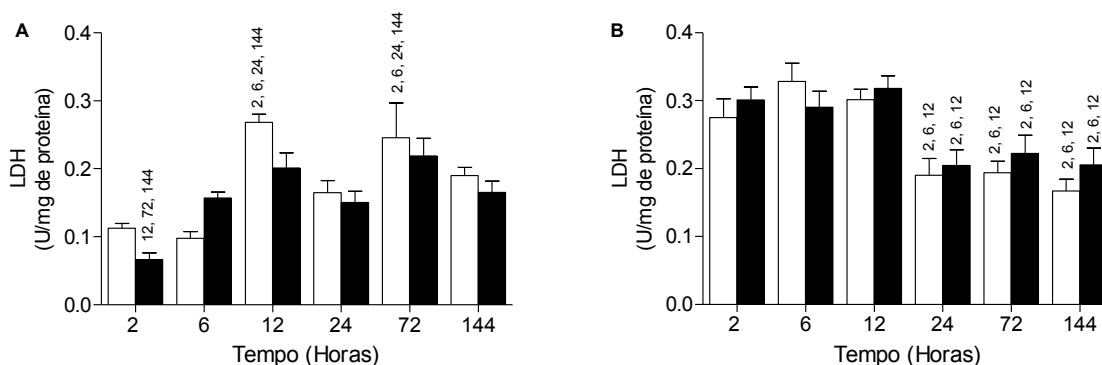
FIGURA 7 – NÍVEIS DE ATIVIDADE DA MALATO DESIDROGENASE (MDH) NOS RINS DE *Notothenia rossii* E *Notothenia coriiceps* SOB ESTRESSE TÉRMICO  
LEGENDA: A) *Notothenia rossii* e B) *Notothenia coriiceps*, expostos a 0°C e 8°C (barra branca e

barra preta, respectivamente) durante 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as temperaturas (teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ ). Os números acima das

barras indicam diferenças entre os tempos de exposição em 0°C e 8°C. Atividades expressas em U/mg de proteína. Os dados estão expressos como média + EPM (erro padrão da média).

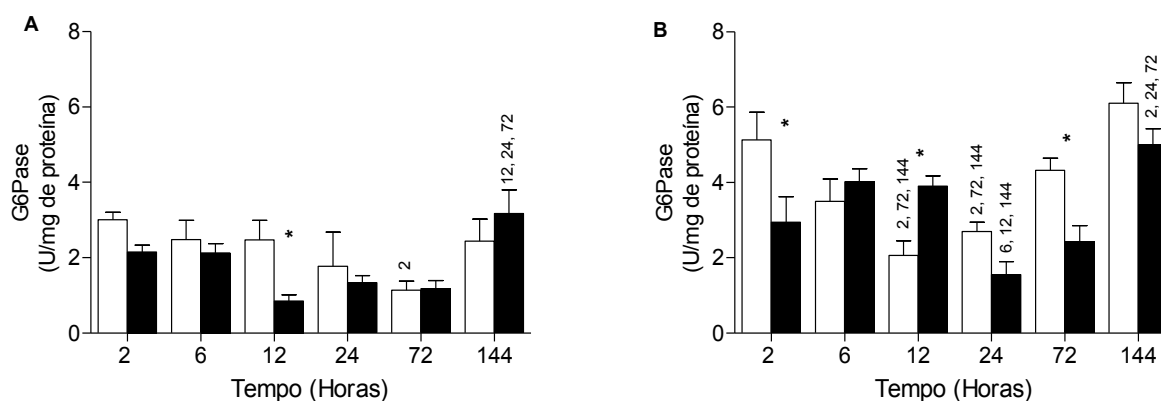
A atividade da LDH em ambas as espécies não foi alterada pela temperatura (Figuras 8A e 8B). Em *N. rossii*, ao longo do tempo de exposição em 0°C os níveis de LDH em 12 e 72 horas aumentaram em relação a 2, 6, 24 e 144 horas. Já em 8°C houve aumento nos níveis de atividade em 12, 72 e 144 horas quando comparados a 2 horas. Em *N. coriiceps*, observou-se em ambas as temperaturas a redução da atividade da LDH em 24, 72 e 144 horas em relação aos tempos iniciais (Tabelas 3 e 4).

FIGURA 8 – NÍVEIS DE ATIVIDADE DA LACTATO DESIDROGENASE (LDH) NOS RINS DE *Notothenia rossii* E *Notothenia coriiceps* SOB ESTRESSE TÉRMICO



LEGENDA: A) *Notothenia rossii* e B) *Notothenia coriiceps*, expostos a 0°C e 8°C (barra branca e barra preta, respectivamente) durante 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as temperaturas (teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ ). Os números acima das barras indicam diferenças entre os tempos de exposição em 0°C e 8°C. Atividades expressas em U/mg de proteína. Os dados estão expressos como média + EPM (erro padrão da média).

Os níveis de atividade da G6Pase em *N. rossii* foram reduzidos em 8°C em 12 horas (Figura 9A). Ao longo do tempo em 8°C houve aumento da atividade da G6Pase em 144 horas em relação a 12, 24 e 72 horas. O perfil da atividade da G6Pase em *N. coriiceps* mostrou redução em 2 e 72 horas na temperatura de 8°C, enquanto que em 12 horas houve elevação. Em 0°C, os menores níveis de atividade da G6Pase foram em 12 e 24 horas em relação a 2, 72 e 144 horas. Em 8°C, ocorreu diminuição da atividade da G6Pase em 24 horas em comparação a 6, 12 e 144 horas, e aumento em 144 horas em relação a 2 e 72 horas. (Figura 9B e Tabelas 3 e 4).

FIGURA 9 – NÍVEIS DE ATIVIDADE DA GLICOSE-6-FOSFATASE (G6Pase) NOS RINS DE *Notothenia rossii* E *Notothenia coriiceps* SOB ESTRESSE TÉRMICO

LEGENDA: A) *Notothenia rossii* e B) *Notothenia coriiceps*, expostos a 0°C e 8°C (barra branca e barra preta, respectivamente) durante 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as temperaturas (teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ ). Os números acima das barras indicam diferenças entre os tempos de exposição em 0°C e 8°C. Atividades expressas em U/mg de proteína. Os dados estão expressos como média + PEM (erro padrão da média).

TABELA 3 - RESULTADOS DO TESTE DE ANOVA (DUAS-VIAS) PARA AS ENZIMAS DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS RENAL DE *Notothenia rossii* E *Notothenia coriiceps*

<i>Notothenia rossii</i>				<i>Notothenia coriiceps</i>			
	Temperatura	Tempo	TE x Ti	Temperatura	Tempo	TE x Ti	
<b>HK</b>	F	0,15	48,16	5,70	0,81	50,40	5,26
	p	0,70	<0,01*	<0,01*	0,37	<0,01*	<0,01*
<b>PFK</b>	F	1,01	36,27	5,53	0,36	16,19	1,68
	p	0,32	<0,01*	<0,01*	0,55	<0,01*	0,15
<b>CS</b>	F	0,02	11,76	2,28	0,50	19,50	1,78
	p	0,89	<0,01*	0,05	0,48	<0,01*	0,12
<b>MDH</b>	F	1,13	5,84	2,39	2,03	19,76	1,34
	p	0,25	<0,01*	0,04*	0,16	<0,01*	0,25
<b>LDH</b>	F	2,98	13,12	1,94	1,11	13,35	0,69
	p	0,09	<0,01*	0,09	0,29	<0,01*	0,63
<b>G6Pase</b>	F	2,69	4,69	1,78	6,42	14,64	5,61
	p	0,10	<0,01*	0,12	0,01*	<0,01*	<0,01*

LEGENDA: Temperatura (TE) (0° e 8°C) e tempo de exposição (Ti) (2, 6, 12, 24, 72, 144 horas). HK (hexoquinase), PFK (fosfofrutoquinase), CS (citrato sintase), MDH (malato desidrogenase), G6Pase (glicose-6-fosfatase) e LDH (lactato desidrogenase). Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as temperaturas (teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ ).



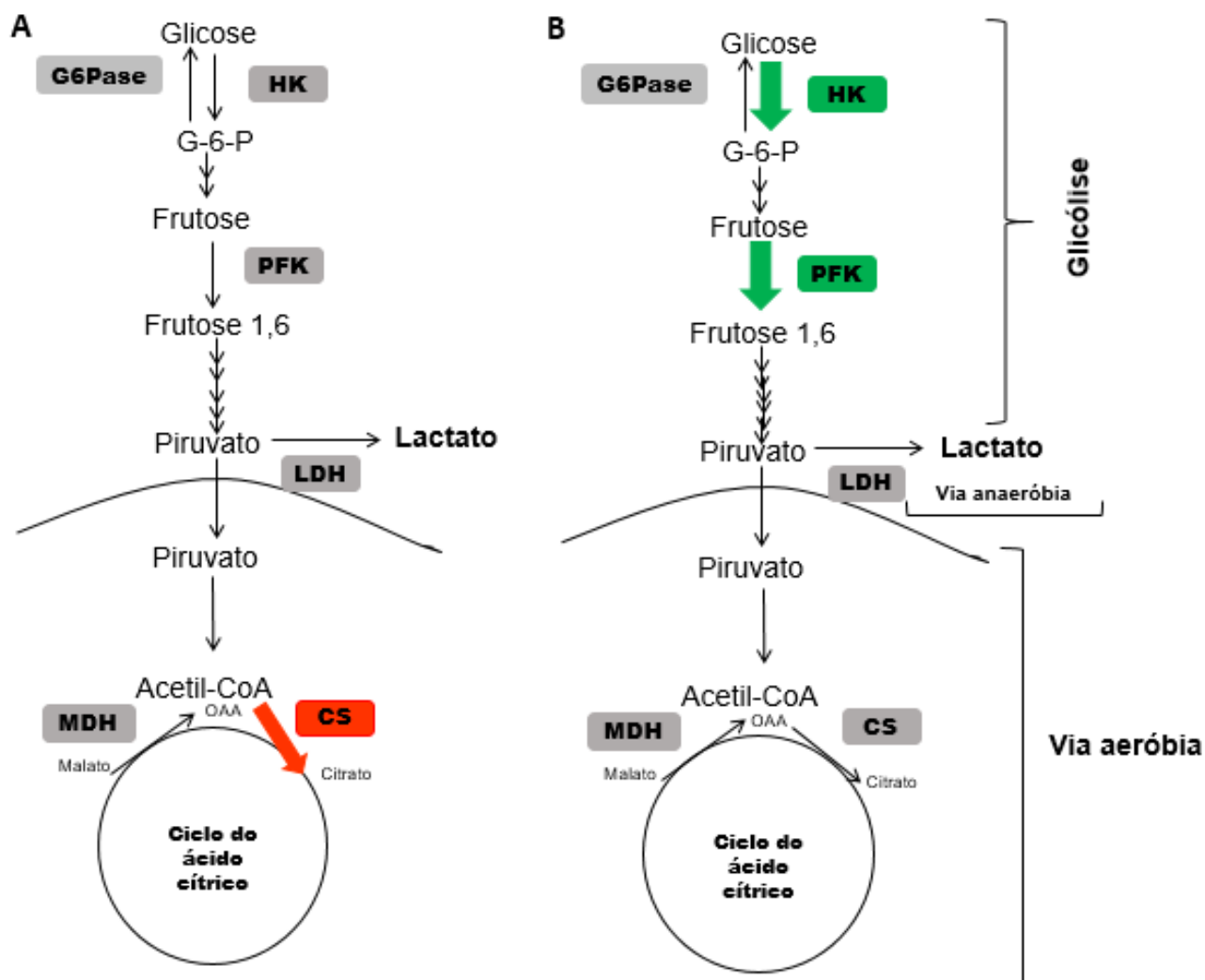
TABELA 4 - VALORES DA MÉDIA ± ERRO-PADRÃO DA MÉDIA DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS RENAL DE *Notothernia rossii* E *Notothernia coriiceps*

Sp	Parâmetro	T °C	2h	6h	12h	24h	72h	144h
NR	HK	0	21,48 ± 1,36 <sup>a</sup>	23,60 ± 2,73 <sup>a</sup>	35,93 ± 1,66 <sup>b</sup>	12,43 ± 1,46 <sup>c</sup>	8,92 ± 0,73 <sup>c</sup>	13,07 ± 1,88 <sup>c</sup>
		8	16,58 ± 1,66 <sup>a</sup>	35,93 ± 3,51 <sup>b *</sup>	30,24 ± 2,88 <sup>b</sup>	11,55 ± 2,33 <sup>a</sup>	12,36 ± 1,42 <sup>a</sup>	12,61 ± 0,98 <sup>a</sup>
	PFK	0	14,16 ± 1,42 <sup>ac</sup>	15,50 ± 2,28 <sup>a</sup>	25,05 ± 2,34 <sup>b</sup>	6,44 ± 1,09 <sup>c</sup>	6,36 ± 1,10 <sup>c</sup>	6,72 ± 0,75 <sup>c</sup>
		8	9,54 ± 1,18 <sup>a</sup>	24,33 ± 2,43 <sup>b *</sup>	19,43 ± 1,83 <sup>b*</sup>	9,03 ± 1,20 <sup>a</sup>	8,42 ± 0,87 <sup>a</sup>	7,88 ± 0,95 <sup>a</sup>
	CS	0	77,34 ± 8,08 <sup>a</sup>	54,44 ± 5,39 <sup>bc</sup>	60,46 ± 6,23 <sup>c</sup>	31,74 ± 4,72 <sup>b</sup>	41,32 ± 6,60 <sup>b</sup>	37,49 ± 4,63 <sup>b</sup>
		8	54,92 ± 5,53 <sup>ab *</sup>	70,28 ± 6,36 <sup>a</sup>	61,43 ± 7,97 <sup>a</sup>	37,58 ± 4,36 <sup>b</sup>	40,93 ± 4,44 <sup>b</sup>	35,42 ± 3,84 <sup>b</sup>
	MDH	0	4,22 ± 0,20 <sup>ab</sup>	4,04 ± 0,74 <sup>ab</sup>	5,22 ± 0,37 <sup>a</sup>	3,26 ± 0,45 <sup>b</sup>	2,90 ± 0,27 <sup>b</sup>	3,04 ± 0,32 <sup>b</sup>
		8	3,21 ± 0,72 <sup>a</sup>	5,22 ± 0,51 <sup>b</sup>	3,78 ± 0,45 <sup>ab</sup>	2,33 ± 0,30 <sup>a</sup>	3,36 ± 0,35 <sup>a</sup>	3,21 ± 0,43 <sup>a</sup>
	LDH	0	0,11 ± 0,007 <sup>a</sup>	0,098 ± 0,010 <sup>a</sup>	0,27 ± 0,011 <sup>b</sup>	0,16 ± 0,018 <sup>a</sup>	0,25 ± 0,05 <sup>b</sup>	0,19 ± 0,01 <sup>a</sup>
		8	0,067 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,16 ± 0,009 <sup>ab</sup>	0,20 ± 0,022 <sup>b</sup>	0,15 ± 0,016 <sup>ab</sup>	0,22 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,17 ± 0,02 <sup>b</sup>
	G6Pase	0	3,01 ± 0,20 <sup>a</sup>	2,49 ± 0,51 <sup>ab</sup>	2,48 ± 0,51 <sup>ab</sup>	1,78 ± 0,90 <sup>ab</sup>	1,13 ± 0,24 <sup>b</sup>	2,44 ± 0,58 <sup>ab</sup>
		8	2,15 ± 0,18 <sup>ab</sup>	2,13 ± 0,24 <sup>ab</sup>	0,85 ± 0,17 <sup>a*</sup>	1,33 ± 0,19 <sup>a</sup>	1,18 ± 0,21 <sup>a</sup>	3,18 ± 0,62 <sup>b</sup>
NC	HK	0	33,51 ± 2,30 <sup>a</sup>	26,70 ± 1,73 <sup>a</sup>	29,86 ± 2,26 <sup>a</sup>	19,50 ± 1,75 <sup>a</sup>	10,69 ± 1,33 <sup>b</sup>	7,97 ± 1,07 <sup>b</sup>
		8	22,85 ± 1,30 <sup>a *</sup>	22,74 ± 2,02 <sup>a</sup>	28,95 ± 1,98 <sup>a</sup>	25,18 ± 0,74 <sup>a</sup>	12,85 ± 1,71 <sup>b</sup>	10,28 ± 1,88 <sup>b</sup>
	PFK	0	4,13 ± 0,49 <sup>ac</sup>	6,24 ± 2,40 <sup>a</sup>	4,73 ± 0,79 <sup>ab</sup>	2,81 ± 0,31 <sup>bc</sup>	1,94 ± 0,17 <sup>c</sup>	1,89 ± 0,24 <sup>c</sup>
		8	5,25 ± 0,80 <sup>a</sup>	5,11 ± 0,48 <sup>a</sup>	4,04 ± 0,55 <sup>ab</sup>	4,16 ± 0,97 <sup>b</sup>	2,68 ± 0,23 <sup>b</sup>	2,86 ± 0,23 <sup>b</sup>
	CS	0	69,52 ± 5,97 <sup>a</sup>	69,96 ± 4,80 <sup>a</sup>	68,45 ± 2,32 <sup>a</sup>	31,03 ± 5,66 <sup>b</sup>	51,15 ± 4,48 <sup>a</sup>	29,33 ± 3,26 <sup>b</sup>
		8	61,43 ± 2,36 <sup>a</sup>	65,40 ± 4,32 <sup>a</sup>	64,89 ± 4,90 <sup>a</sup>	48,59 ± 4,99 <sup>ab *</sup>	57,68 ± 7,35 <sup>a</sup>	33,76 ± 4,66 <sup>b</sup>
	MDH	0	5,43 ± 0,30 <sup>a</sup>	6,12 ± 0,31 <sup>a</sup>	5,18 ± 0,35 <sup>a</sup>	2,84 ± 0,30 <sup>b</sup>	3,35 ± 0,30 <sup>b</sup>	3,02 ± 0,33 <sup>b</sup>
		8	4,70 ± 0,60 <sup>a</sup>	5,03 ± 0,30 <sup>a</sup>	4,60 ± 0,21 <sup>a</sup>	2,83 ± 0,29 <sup>b</sup>	3,50 ± 0,36 <sup>b</sup>	3,49 ± 0,44 <sup>b</sup>
	LDH	0	0,27 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,33 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,30 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,19 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,19 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,17 ± 0,02 <sup>b</sup>
		8	0,30 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,29 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,32 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,20 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,22 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,21 ± 0,02 <sup>b</sup>
	G6Pase	0	5,13 ± 2,29 <sup>a</sup>	3,49 ± 0,60 <sup>ab</sup>	2,06 ± 0,39 <sup>b</sup>	0,19 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,19 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,17 ± 0,02 <sup>a</sup>
		8	2,95 ± 0,63 <sup>a *</sup>	4,02 ± 0,35 <sup>ac</sup>	3,90 ± 0,26 <sup>ac *</sup>	0,20 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,22 ± 0,03 <sup>ab *</sup>	0,21 ± 0,02 <sup>c</sup>

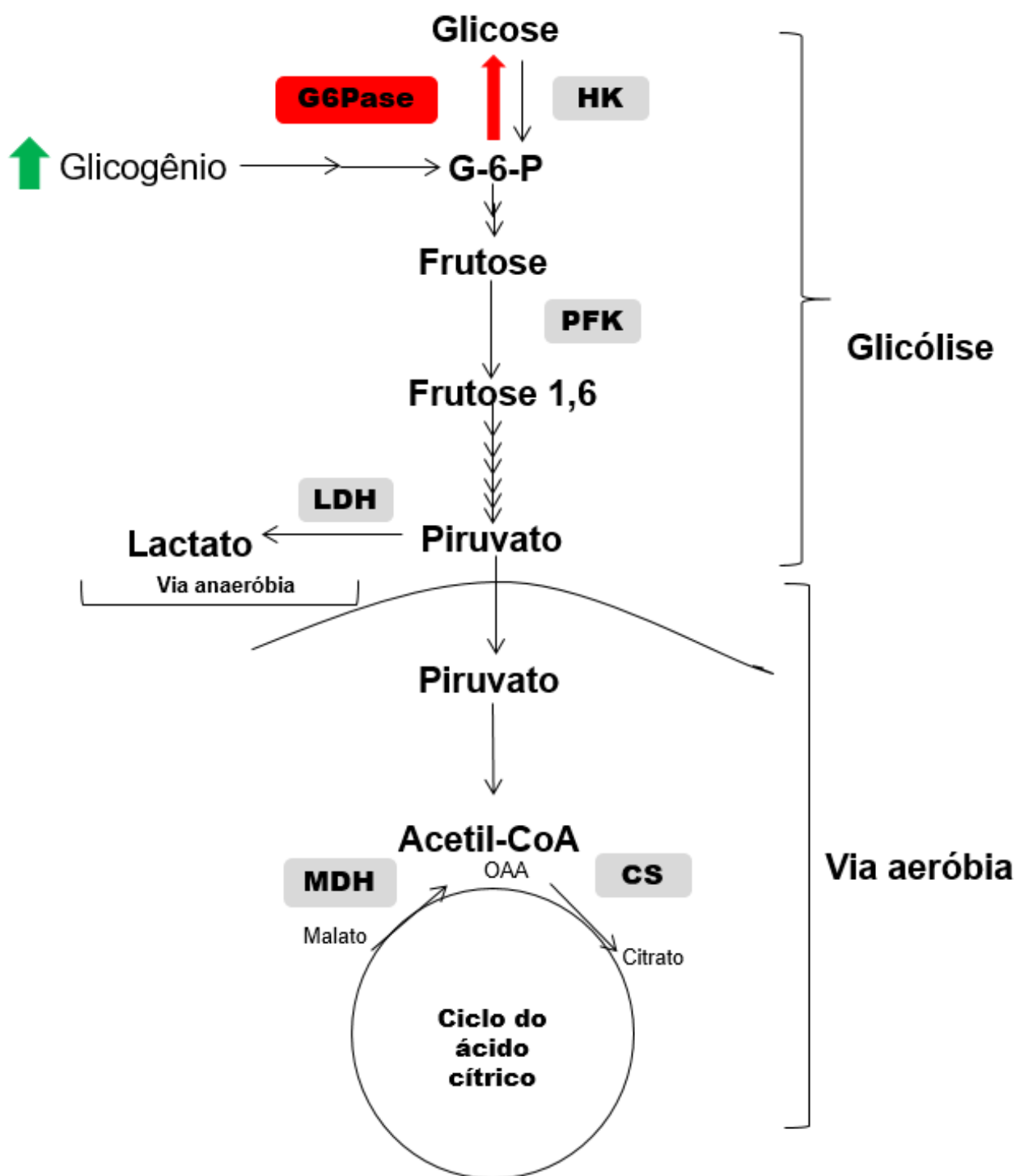
LEGENDA: Animais expostos a 0°C (controle) e 8°C (experimentais) durante 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas. HK (hexoquinase), PFK (fosfofrutoquinase), G6Pase (glicose-6-fosfato desidrogenase), CS (citrato sintase), MDH (malato desidrogenase), G6Pase (glicose-6-fosfatase) e LDH (lactato desidrogenase). As atividades da HK, PFK, CS, MDH, LDH e G6Pase expressas em U/mg de proteína. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as temperaturas (teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ ). As letras diferentes indicam diferenças entre os tempos de exposição em 0°C e 8°C. Os dados estão expressos como média ± EPM (erro padrão da média).

Nas figuras 10 e 11 segue a esquematização dos resultados obtidos dos marcadores do metabolismo energético de carboidratos alterados frente o estresse térmico (8°C) de curto prazo (2 a 144 horas) no rim de *N. rossii* e *N. coriiceps*, respectivamente.

FIGURA 10 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS RENAL EM *Notothenia rossii* SUBMETIDOS AO ESTRESSE TÉRMICO. A em 2h e B em 6h



LEGENDA: G6Pase (glicose-6-fosfatase); G-6-P (glicose-6-fosfato); HK (hexoquinase); PFK (fosfofrutoquinase); LDH (lactato desidrogenase; CS (citrato sintase); MDH (malato desidrogenase); OOA (oxaloacetato). Setas em vermelho: níveis de atividades reduziram; Setas em verde: níveis de atividade aumentaram; Setas pretas: sem alteração.

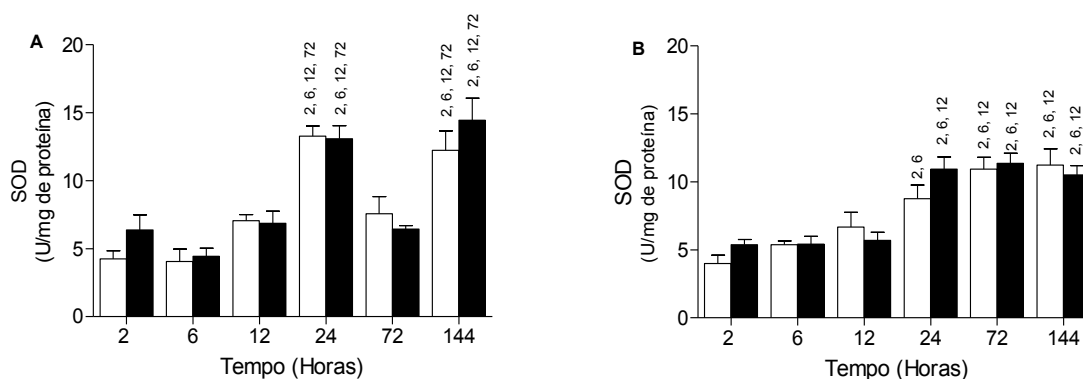
FIGURA 11 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS RENAL EM *Notothenia coriiceps* SUBMETIDOS AO ESTRESSE TÉRMICO

LEGENDA: G6Pase (glicose-6-fosfatase); G-6-P (glicose-6-fosfato); HK (hexoquinase); PFK (fosfofrutoquinase); LDH (lactato desidrogenase); CS (citrato sintase); MDH (malato desidrogenase); OOA (oxaloacetato). Setas em vermelho: níveis de atividades reduziram; Setas em verde: níveis de atividade aumentaram; Setas pretas: sem alteração.

#### 4.3 EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO NOS NÍVEIS DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE RENAL

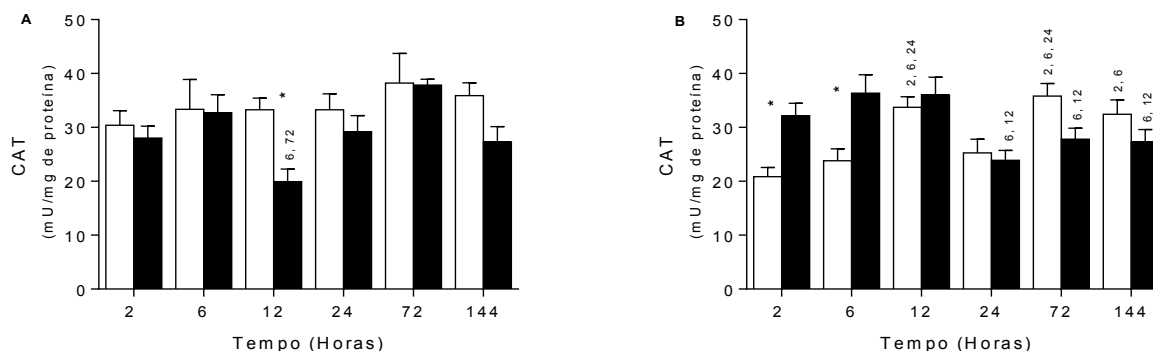
A atividade da SOD em ambas as espécies não foi alterada pelo aquecimento. Ao longo do tempo, em *N. rossii*, houve aumento da SOD em 0°C em 24 e 144 horas em relação aos demais tempos (Figura 12A). Em *N. coriiceps* (Figura 12B), ao longo do tempo, ocorreu aumento da SOD em 0°C em 24 horas, quando comparado com 2 e 6 horas e em 72 e 144 horas em relação a 2, 6 e 12 horas. Na temperatura de 8°C ocorreu aumento da SOD em 24, 72 e 144 horas em relação a 2, 6 e 12 horas (Tabelas 5 e 6).

FIGURA 12 – NÍVEIS DE ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) NOS RINS DE *Notothenia rossii* E *Notothenia coriiceps* SOB ESTRESSE TÉRMICO



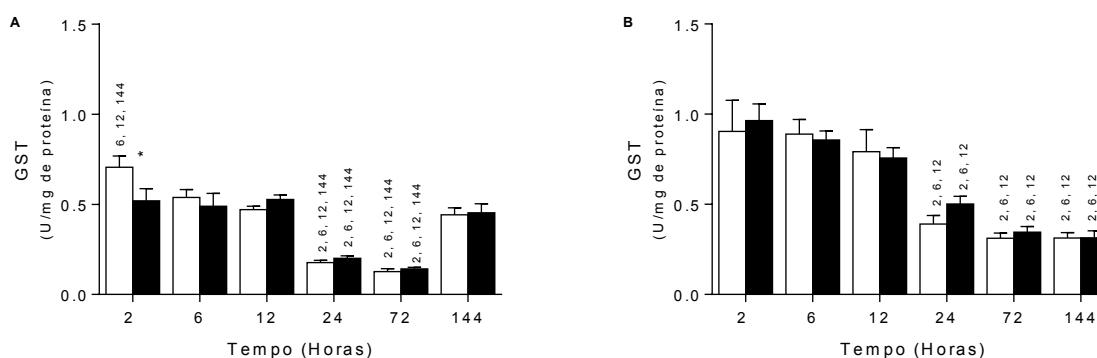
LEGENDA: A) *Notothenia rossii* e B) *Notothenia coriiceps*, expostos a 0°C e 8°C (barra branca e barra preta, respectivamente) durante 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as temperaturas (teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ ). Os números acima das barras indicam diferenças entre os tempos de exposição em 0°C e 8°C. Atividades expressas em mU/mg de proteína. Os dados estão expressos como média + EPM (erro padrão da média).

Os níveis de atividade da CAT em *N. rossii* (Figura 13A) diminuíram em 8°C em relação ao grupo controle (0°C) em 12 horas. Ao longo do tempo observou-se a redução da CAT, em 8°C, 12 horas, quando comparado com 6 e 72 horas. Em *N. coriiceps* (Figura 13B), houve aumento da CAT, em 8°C, 2 e 6 horas, em relação ao controle. Ao longo do tempo, em 0°C, a CAT foi maior em 12 e 72 horas em relação a 2, 6 e 24 horas, e em 144 horas em relação a 2 e 6 horas. Em 8°C, observou-se a redução dos níveis da CAT nos tempos de 24, 72 e 144 horas em relação a 6 e 12 horas (Tabelas 5 e 6).

FIGURA 13 – NÍVEIS DE ATIVIDADE DA CATALASE (CAT) NOS RINS DE *Notothenia rossii* E *Notothenia coriiceps* SOB ESTRESSE TÉRMICO

LEGENDA: A) *Notothenia rossii* e B) *Notothenia coriiceps*, expostos a 0°C e 8°C (barra branca e barra preta, respectivamente) durante 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as temperaturas (teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ ). Os números acima das barras indicam diferenças entre os tempos de exposição em 0°C e 8°C. Atividades expressas em mU/mg de proteína. Os dados estão expressos como média + EPM (erro padrão da média).

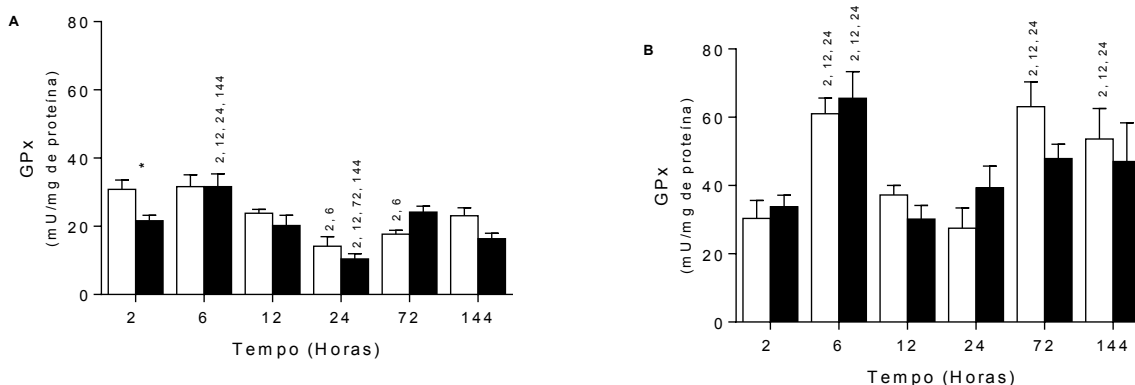
Em *N. rossii* (Figura 14A) aquecimento a 8°C reduziu os níveis de atividade da GST, em 2 horas. Ao longo do tempo, em 0°C constatou-se maior nível de atividade da GST em 2 horas quando comparado com 6, 12 e 144 horas e diminuição em 24 e 72 horas quando comparado com 2, 6, 12 e 144 horas. Já em 8°C, houve diminuição da atividade da GST em 24 e 72 horas em relação a 2, 6, 12 e 144 horas. Em *N. coriiceps* (Figura 14B), o aquecimento em 8°C não alterou os níveis de atividade da GST. Ao longo do tempo em 0°C e 8°C houve redução dos níveis de atividade da GST em 24, 72 e 144 horas em relação aos tempos anteriores (Tabelas 5 e 6).

FIGURA 14 – NÍVEIS DE ATIVIDADE DA GLUTATIONA-S-TRANSFERASE (GST) NOS RINS DE *Notothenia rossii* E *Notothenia coriiceps* SOB ESTRESSE TÉRMICO

LEGENDA: A) *Notothernia rossii* e B) *Notothernia coriiceps*, expostos a 0°C e 8°C (barra branca e barra preta, respectivamente) durante 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as temperaturas (teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ ). Os números acima das barras indicam diferenças entre os tempos de exposição em 0°C e 8°C. Atividades expressas em mU/mg de proteína. Os dados estão expressos como média + EPM (erro padrão da média).

Os níveis de atividade da GPx, em *N. rossii* (Figura 15A) foram reduzidos em 2 horas pelo aquecimento em 8°C em relação ao grupo controle (0°C). Ao longo do tempo, houve redução dos níveis de atividade da GPx em 0°C, em 24 e 72 horas quando comparado com 2 e 6 horas. Em 8°C houve maior atividade da GPx em 6 horas quando comparado com 2, 12, 24 e 144 horas e uma diminuição em 24 horas em relação a 2, 12, 72 e 144 horas. Em *N. coriiceps* (Figura 15B) o aquecimento a 8°C não alterou os níveis de atividade da GPx em relação a 0°C. Ao longo do tempo, em 0°C, 6, 72 e 144 horas, houve aumento da GPx em relação aos demais tempos. Em 8°C observou-se elevação em 6 horas quando comparado com 2, 12 e 24 horas (Tabelas 5 e 6).

FIGURA 15 – NÍVEIS DE ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE (GPx) NOS RINS DE *Notothernia rossii* E *Notothernia coriiceps* SOB ESTRESSE TÉRMICO

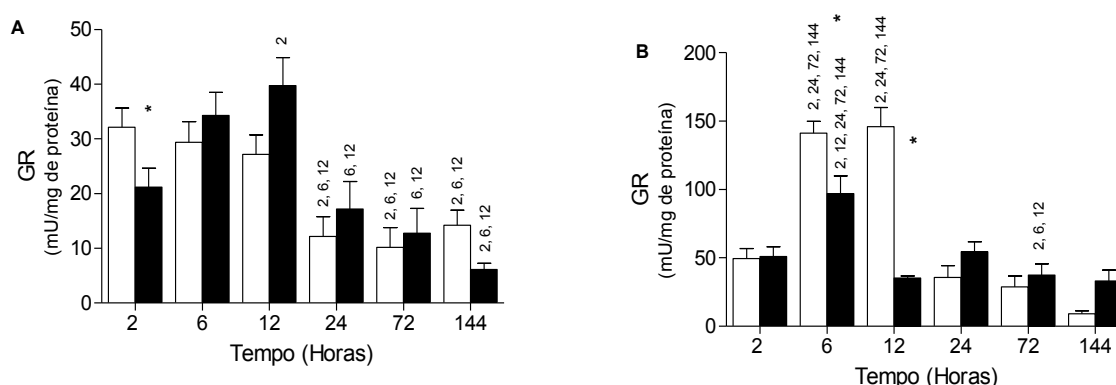


LEGENDA: A) *Notothernia rossii* e B) *Notothernia coriiceps*, expostos a 0°C e 8°C (barra branca e barra preta, respectivamente) durante 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as temperaturas (teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ ). Os números acima das barras indicam diferenças entre os tempos de exposição em 0°C e 8°C. Atividades expressas em mU/mg de proteína. Os dados estão expressos como média + EPM (erro padrão da média).

Em *N. rossii* (Figura 16A), houve redução dos níveis de atividade da GR em peixes mantidos por 2 horas em 8°C em relação ao grupo controle. Em 0°C, 24, 72 e 144 horas, houve redução da atividade da GR quando comparado com as 12 horas iniciais. Em 8°C, em 24 e 72 horas, ocorreu redução dos níveis de atividade quando comparado com 6 e 12 horas e em 144 horas em relação aos

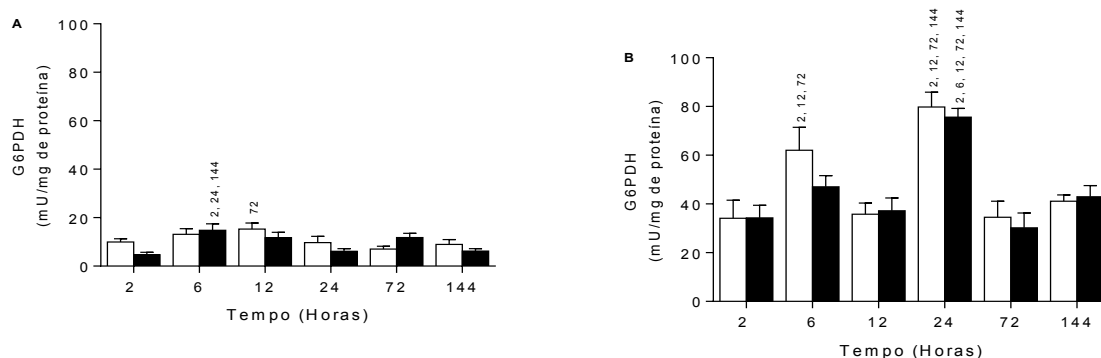
tempos de 2, 6 e 12 horas. Em *N. coriiceps* (Figura 16B), houve diminuição da atividade da GR decorrente do aumento da temperatura em 6 e 12 horas. Ao longo do tempo, em 0°C houve aumento da GR em 6 e 12 horas em relação aos demais tempos. Em 8°C, 6 horas, houve aumento dos níveis da GR em relação aos demais tempos (Tabelas 5 e 6).

FIGURA 16 – NÍVEIS DE ATIVIDADE DA GLUTATIONA REDUTASE (GR) NOS RINS DE *Notothenia rossii* E *Notothenia coriiceps* SOB ESTRESSE TÉRMICO



LEGENDA: A) *Notothenia rossii* e B) *Notothenia coriiceps*, expostos a 0°C e 8°C (barra branca e barra preta, respectivamente) durante 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as temperaturas (teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ ). Os números acima das barras indicam diferenças entre os tempos de exposição em 0°C e 8°C. Atividades expressas em mU/mg de proteína. Os dados estão expressos como média + SEM (erro padrão da média).

A atividade da G6PDH, em ambas as espécies não sofreu alteração a 8°C. Em *N. rossii* (Figura 17A), ao longo do tempo em 0°C houve maior atividade da G6PDH em 12 horas em relação a 72 horas. Enquanto que em 8°C, o maior nível de atividade ocorreu em 6 horas em relação a 2, 24 e 144 horas. Em *N. coriiceps* (Figura 17B), ao longo do tempo houve maior atividade, em 0°C e 8°C, em 24 horas quando comparado a 2, 12, 72 e 144 horas. Foi observado elevação dos níveis de atividade da G6PDH, em 0°C, 6 horas, quando comparado com 2, 12 e 72 horas (Tabelas 5 e 6).

FIGURA 17 – NÍVEIS DE ATIVIDADE DA GLUCOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE (G6PDH) NOS RINS DE *Notothenia rossii* E *Notothenia coriiceps* SOB ESTRESSE TÉRMICO

LEGENDA: A) *Notothenia rossii* e B) *Notothenia coriiceps*, expostos a 0°C e 8°C (barra branca e barra preta, respectivamente) durante 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as temperaturas (teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ ). Os números acima das barras indicam diferenças entre os tempos de exposição em 0°C e 8°C. Atividades expressas em U/mg de proteína. Os dados estão expressos como média + EPM (erro padrão da média).

TABELA 5 - RESULTADOS DO TESTE DE ANOVA (DUAS-VIAS) PARA AS ENZIMAS DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE RENAL DE *Notothenia rossii* E *Notothenia coriiceps*

<i>Notothenia rossii</i>				<i>Notothenia coriiceps</i>			
	Temperatura	Tempo	TE x Ti	Temperatura	Tempo	TE x Ti	
<b>SOD</b>	F	1,11	32,25	0,95	0,66	23,98	1,09
	p	0,29	<0,01*	0,45	0,42	<0,01*	0,37
<b>CAT</b>	F	8,88	3,07	1,35	1,80	4,31	5,71
	p	<0,01*	0,01*	0,25	0,18	<0,01*	<0,01*
<b>GST</b>	F	1,15	40,62	2,09	0,33	32,90	0,34
	p	0,29	<0,01*	0,07	0,57	<0,01*	0,89
<b>GPx</b>	F	3,95	13,96	2,67	0,15	7,79	1,09
	p	0,04*	<0,01*	0,03*	0,70	<0,01*	0,37
<b>GR</b>	F	0,13	15,02	2,71	11,03	36,42	17,07
	p	0,02*	<0,01*	0,72	<0,01*	<0,01*	<0,01*
<b>G6PDH</b>	F	1,99	4,97	2,24	1,09	19,42	0,62
	p	0,16	<0,01*	0,06	0,30	<0,01*	0,68

LEGENDA: Temperatura (TE) (0° e 8°C) e tempo de exposição (Ti) (2, 6, 12, 24, 72, 144 horas). SOD (superóxido dismutase), CAT (catalase), GST (glutathione-S-transferase), GPx (glutathione peroxidase), GR (glutathione redutase) e G6PDH (glucose-6-fosfato desidrogenase). Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as temperaturas (teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ ).



TABELA 6 - VALORES DA MÉDIA ± ERRO-PADRÃO DA MÉDIA DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE RENAL DE *Notothenia rossii* E *Notothenia coriiceps*

Sp	Parâmetro	T °C	2h	6h	12h	24h	72h	144h
NR	SOD	0	4,26 ± 0,59 <sup>a</sup>	4,05 ± 0,92 <sup>a</sup>	7,06 ± 0,45 <sup>a</sup>	13,29 ± 0,74 <sup>b</sup>	7,57 ± 1,27 <sup>a</sup>	12,25 ± 1,42 <sup>b</sup>
		8	6,37 ± 1,05 <sup>a</sup>	4,44 ± 0,61 <sup>a</sup>	6,87 ± 0,95 <sup>a</sup>	13,09 ± 0,97 <sup>b</sup>	6,44 ± 0,27 <sup>a</sup>	14,46 ± 1,61 <sup>b</sup>
	CAT	0	30,41 ± 2,68	33,37 ± 5,54	33,27 ± 2,19	33,28 ± 2,95	38,22 ± 5,53	35,88 ± 2,39
		8	28,01 ± 2,21 <sup>ab</sup>	32,73 ± 3,34 <sup>a</sup>	19,95 ± 2,32 <sup>b*</sup>	29,19 ± 3,02 <sup>ab</sup>	37,87 ± 1,08 <sup>a</sup>	27,31 ± 2,82 <sup>ab</sup>
	GST	0	0,71 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,54 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,47 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,18 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,13 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,44 ± 0,04 <sup>b</sup>
		8	0,52 ± 0,07 <sup>a*</sup>	0,49 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,53 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,20 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,14 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,45 ± 0,05 <sup>a</sup>
	GPx	0	30,85 ± 2,72 <sup>a</sup>	31,65 ± 3,43 <sup>a</sup>	23,84 ± 1,10 <sup>ac</sup>	14,17 ± 2,81 <sup>c</sup>	17,67 ± 1,15 <sup>c</sup>	23,11 ± 2,35 <sup>ac</sup>
		8	21,65 ± 1,57 <sup>*</sup>	31,62 ± 3,73	20,20 ± 3,19	10,42 ± 1,56	24,18 ± 1,72	16,40 ± 1,56
	GR	0	32,13 ± 3,51 <sup>a</sup>	29,40 ± 3,77 <sup>a</sup>	27,18 ± 3,55 <sup>a</sup>	12,15 ± 3,68 <sup>b</sup>	10,18 ± 3,60 <sup>b</sup>	14,24 ± 2,73 <sup>b</sup>
		8	21,21 ± 3,44 <sup>ad*</sup>	34,30 ± 4,22 <sup>ac</sup>	39,78 ± 5,36 <sup>c</sup>	17,17 ± 5,02 <sup>bd</sup>	12,78 ± 4,55 <sup>bd</sup>	6,09 ± 1,20 <sup>b</sup>
	G6PDH	0	9,95 ± 1,32 <sup>ab</sup>	13,10 ± 2,39 <sup>ab</sup>	15,32 ± 2,44 <sup>a</sup>	9,72 ± 2,60 <sup>ab</sup>	7,03 ± 1,22 <sup>b</sup>	8,99 ± 2,00 <sup>ab</sup>
		8	4,70 ± 1,00 <sup>a</sup>	14,76 ± 2,68 <sup>b</sup>	11,74 ± 2,26 <sup>ab</sup>	6,12 ± 1,09 <sup>a</sup>	11,81 ± 1,70 <sup>ab</sup>	6,22 ± 1,00 <sup>a</sup>
NC	SOD	0	4,00 ± 0,56 <sup>a</sup>	5,39 ± 0,27 <sup>a</sup>	6,68 ± 1,10 <sup>ac</sup>	8,77 ± 0,96 <sup>bc</sup>	10,93 ± 0,89 <sup>b</sup>	11,23 ± 1,19 <sup>b</sup>
		8	5,40 ± 0,35 <sup>a</sup>	5,43 ± 0,57 <sup>a</sup>	5,71 ± 0,55 <sup>a</sup>	10,95 ± 0,89 <sup>b</sup>	11,36 ± 0,74 <sup>b</sup>	10,51 ± 0,68 <sup>b</sup>
	CAT	0	20,86 ± 1,54 <sup>a*</sup>	31,35 ± 5,48 <sup>a*</sup>	36,67 ± 3,45 <sup>b</sup>	25,27 ± 2,40 <sup>ac</sup>	35,80 ± 2,33 <sup>b</sup>	32,45 ± 2,64 <sup>bc</sup>
		8	32,14 ± 2,22 <sup>ab</sup>	36,37 ± 3,40 <sup>a</sup>	39,64 ± 4,30 <sup>a</sup>	23,89 ± 1,85 <sup>b</sup>	27,80 ± 2,07 <sup>b</sup>	27,31 ± 2,31 <sup>b</sup>
	GST	0	0,90 ± 0,16 <sup>a</sup>	0,89 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,79 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,39 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,31 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,31 ± 0,03 <sup>b</sup>
		8	0,96 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,86 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,76 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,50 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,35 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,31 ± 0,04 <sup>b</sup>
	GPx	0	37,99 ± 19,65 <sup>a</sup>	61,06 ± 4,58 <sup>b</sup>	37,26 ± 2,80 <sup>a</sup>	32,06 ± 6,51 <sup>a</sup>	57,26 ± 8,73 <sup>b</sup>	49,66 ± 8,92 <sup>b</sup>
		8	42,44 ± 8,66 <sup>a</sup>	62,33 ± 7,62 <sup>b</sup>	37,71 ± 7,78 <sup>a</sup>	36,07 ± 6,48 <sup>a</sup>	43,80 ± 5,58 <sup>ab</sup>	47,03 ± 11,35 <sup>ab</sup>
	GR	0	49,51 ± 6,82 <sup>a</sup>	141,22 ± 8,72 <sup>b</sup>	145,88 ± 14,25 <sup>b</sup>	35,70 ± 8,10 <sup>a</sup>	28,73 ± 7,96 <sup>a</sup>	9,09 ± 2,37 <sup>a</sup>
		8	51,15 ± 6,46 <sup>a</sup>	97,08 ± 12,85 <sup>b*</sup>	35,22 ± 1,36 <sup>a*</sup>	54,41 ± 7,33 <sup>ac</sup>	37,39 ± 8,14 <sup>c</sup>	33,08 ± 7,93 <sup>ac</sup>
	G6PDH	0	34,13 ± 6,73 <sup>a</sup>	62,98 ± 10,77 <sup>bc</sup>	35,78 ± 4,64 <sup>a</sup>	58,62 ± 11,00 <sup>b</sup>	34,56 ± 6,54 <sup>a</sup>	41,13 ± 2,56 <sup>ac</sup>
		8	34,28 ± 4,90 <sup>a</sup>	47,03 ± 4,64 <sup>a</sup>	37,22 ± 4,93 <sup>a</sup>	75,64 ± 3,60 <sup>b</sup>	30,21 ± 6,06 <sup>a</sup>	43,00 ± 4,55 <sup>a</sup>

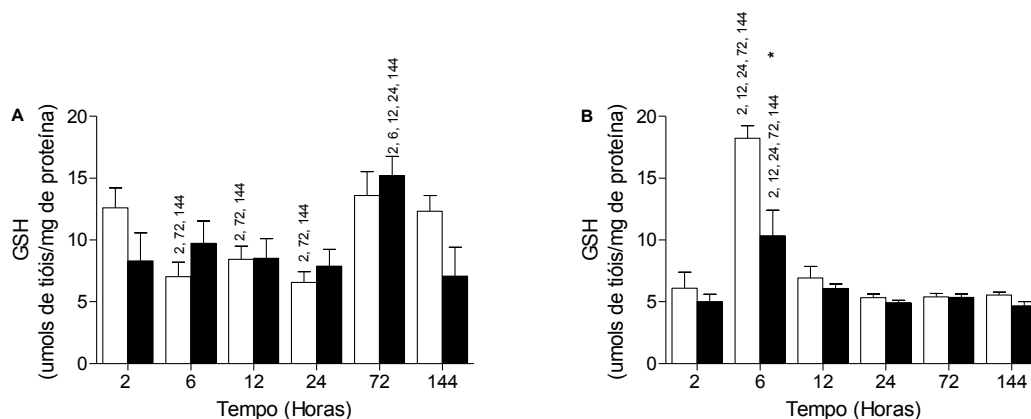
LEGENDA: Animais expostos a 0°C (controle) e 8°C (experimentais) durante 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas. SOD (superóxido dismutase), CAT (catalase), GST (glutathione-S-transferase), GPx (glutathione peroxidase), GR (glutathione redutase) e G6PDH (glucose-6-fosfato desidrogenase). As atividades da GST e SOD expressas em U/mg de proteína e CAT, GPx, GR e G6PDH expressas em mU/mg de proteína. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as temperaturas (teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ ). As letras diferentes indicam diferenças entre os tempos de exposição em 0°C e 8°C. Os dados estão expressos como média ± EPM (erro padrão da média).

#### 4.4 EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO NA CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) E MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS RENAIIS

Em *N. rossii*, a concentração renal de tióis não proteicos (GSH) não sofreu alteração pelo aquecimento em relação ao controle (Figura 18A). Ao longo do tempo em 0°C ocorreram menores concentrações de GSH em 6, 12 e 24 horas em relação a 2, 72 e 144 horas. Enquanto que em 8°C, ocorreu aumento da concentração de GSH em 72 horas em relação aos demais tempos. Em *N. coriiceps* (Figura 18B) houve redução da concentração de GSH em 6 horas em 8°C em relação a 0°C. Ao longo do tempo em ambas as temperaturas se

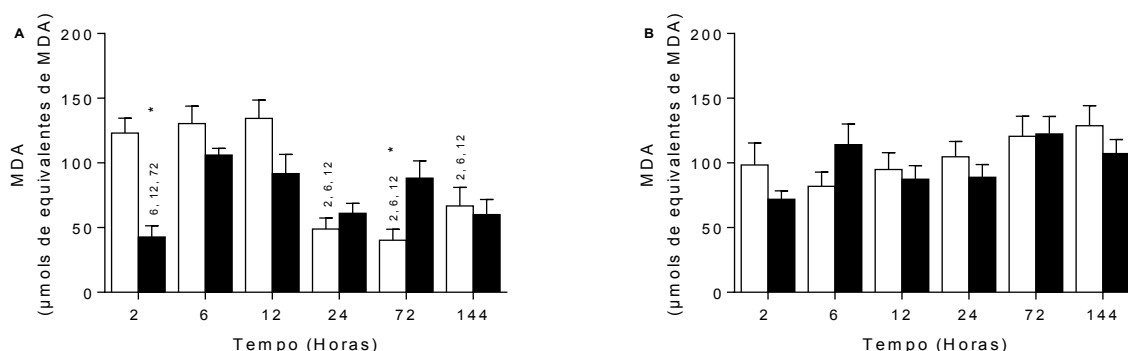
observaram maiores concentrações em 6 horas quando comparado com os demais tempos (Tabelas 7 e 8).

FIGURA 18 – CONCENTRAÇÃO DE TIÓIS NÃO PROTEICOS (GSH) NOS RINS DE *Notothenia rossii* E *Notothenia coriiceps* SOB ESTRESSE TÉRMICO



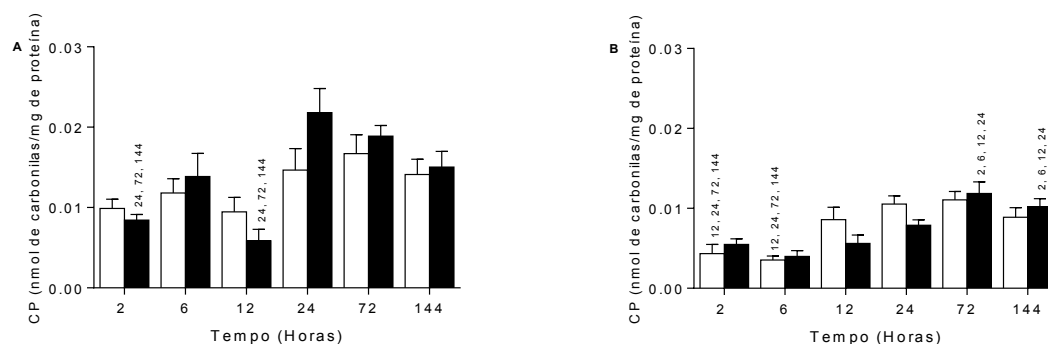
LEGENDA: A) *Notothenia rossii* e B) *Notothenia coriiceps*, expostos a 0°C e 8°C (barra branca e barra preta, respectivamente) durante 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as temperaturas (teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ ). Os números acima das barras indicam diferenças entre os tempos de exposição em 0°C e 8°C. Atividades expressas em mU/mg de proteína. Os dados estão expressos como média + EPM (erro padrão da média).

Em *N. rossii* (Figura 19A), o conteúdo de MDA foi reduzido em 2 horas e elevado em 72 horas em 8°C em relação a 0°C. Ao longo do tempo, em 0°C houve redução dos equivalentes de MDA a partir de 24 horas em relação a 2, 6 e 12 horas. Enquanto, que em 8°C, os menores níveis constatados foram em 2 horas em relação a 6, 12 e 72 horas. Em *N. coriiceps* (Figura 19B) os níveis de MDA não foram alterados pelo efeito da temperatura e nem ao longo do tempo de exposição (Tabelas 7 e 8).

FIGURA 19 – NÍVEIS DE MALONDIALDEÍDO (MDA) NOS RINS DE *Notothernia rossii* E *Notothernia coriiceps* SOB ESTRESSE TÉRMICO

LEGENDA: A) *Notothernia rossii* e B) *Notothernia coriiceps*, expostos a 0°C e 8°C (barra branca e barra preta, respectivamente) durante 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as temperaturas (teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ ). Os números acima das barras indicam diferenças entre os tempos de exposição em 0°C e 8°C. Atividades expressas em mU/mg de proteína. Os dados estão expressos como média + SEM (erro padrão da média).

Em ambas as espécies não foram observadas alterações na concentração de CP em decorrência da elevação térmica. Em *N. rossii* (Figura 20A), ao longo do tempo em 8°C, houve elevação dos níveis de CP em 24, 72 e 144 horas em relação a 2 e 12 horas. Já, em *N. coriiceps* (Figura 20B), constatou-se em 0°C menores concentrações de CP em 2 e 6 horas quando comparados com os demais tempos. Em 8°C, as maiores concentrações foram observadas em 72 e 144 horas em relação aos demais tempos analisados (Tabelas 7 e 8).

FIGURA 20 – NÍVEIS DE CARBONILAÇÃO PROTEICA (CP) NOS RINS DE *Notothernia rossii* E *Notothernia coriiceps* SOB ESTRESSE TÉRMICO

LEGENDA: A) *Notothernia rossii* e B) *Notothernia coriiceps*, expostos a 0°C e 8°C (barra branca e barra preta, respectivamente) durante 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as temperaturas (teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ ). Os números acima das

barras indicam diferenças entre os tempos de exposição em 0°C e 8°C. Atividades expressas em mU/mg de proteína. Os dados estão expressos como média + EPM (erro padrão da média).

TABELA 7 - RESULTADOS DO TESTE DE ANOVA (DUAS-VIAS) PARA AS CONCENTRAÇÕES DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH), MALONDIALDEÍDO (MDA) E CARBONILAÇÃO PROTEICA (CP) RENAL DE *Notothenia rossii* E *Notothenia coriiceps*

		<i>Notothenia rossii</i>			<i>Notothenia coriiceps</i>		
		Temperatura	Tempo	TE x Ti	Temperatura	Tempo	TE x Ti
<b>GSH</b>	F	0,62	5,55	2,06	12,83	33,58	4,42
	p	0,43	<0,01*	0,08	<0,01*	<0,01*	<0,01*
<b>MDA</b>	F	5,29	10,89	7,34	0,69	2,57	1,33
	p	0,02*	<0,01*	<0,01*	0,41	0,03*	0,26
<b>CP</b>	FF	0,027	7,72	0,99	0,25	15,77	1,67
	pp	0,660	<0,001*	0,566	0,682	<0,001*	0,155

LEGENDA: Temperatura (TE) (0° e 8°C) e tempo de exposição (Ti) (2, 6, 12, 24, 72, 144 horas). Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as temperaturas (teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ ).

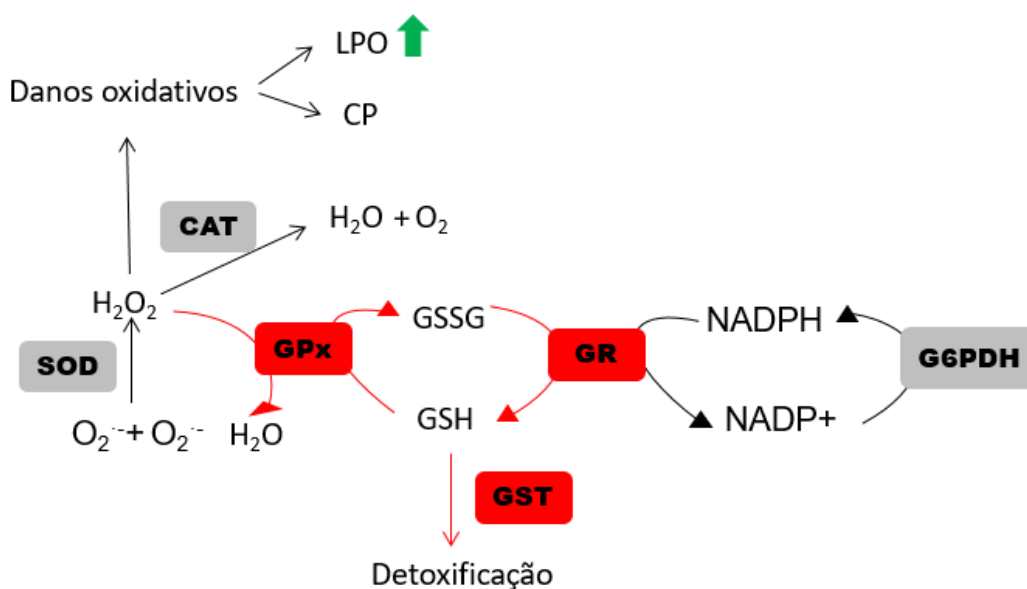
TABELA 8 - VALORES DA MÉDIA ± ERRO-PADRÃO DA MÉDIA DAS CONCENTRAÇÕES DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) E DOS MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS: CARBONILAÇÃO PROTEICA (CP) E MALONDIALDEÍDO (MDA) RENAL DE *Notothenia rossii* E *Notothenia coriiceps*

Spp	Parâmetro	T°C	2h	6h	12h	24h	72h	144h
<b>NR</b>	<b>GSH</b>	0	12,62 ± 1,62 <sup>a</sup>	7,04 ± 1,17 <sup>b</sup>	8,44 ± 1,07 <sup>b</sup>	6,57 ± 0,86 <sup>b</sup>	13,59 ± 1,96 <sup>a</sup>	12,33 ± 1,27 <sup>a</sup>
		8	8,31 ± 2,16 <sup>a</sup>	12,43 ± 3,12 <sup>b</sup>	10,42 ± 2,51 <sup>b</sup>	7,89 ± 1,35 <sup>b</sup>	15,20 ± 1,56 <sup>a</sup>	5,59 ± 2,09 <sup>a</sup>
	<b>MDA</b>	0	129,08 ± 22,07 <sup>a</sup>	130,41 ± 13,55 <sup>a</sup>	134,49 ± 14,11 <sup>a</sup>	48,89 ± 8,57 <sup>b</sup>	40,32 ± 8,37 <sup>b</sup>	66,76 ± 14,33 <sup>b</sup>
		8	42,71 ± 8,78 <sup>a*</sup>	106,12 ± 5,19 <sup>bc</sup>	91,71 ± 15,80 <sup>bc</sup>	61,08 ± 7,64 <sup>ac</sup>	88,24 ± 13,37 <sup>bc*</sup>	60,16 ± 11,59 <sup>ac</sup>
	<b>CP</b>	0	0,010 ± 0,011	0,012 ± 0,002	0,009 ± 0,002	0,015 ± 0,003	0,017 ± 0,002	0,014 ± 0,002
		8	0,008 ± 0,0007 <sup>a</sup>	0,014 ± 0,003 <sup>ab</sup>	0,006 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,018 ± 0,003 <sup>b</sup>	0,019 ± 0,001 <sup>b</sup>	0,020 ± 0,005 <sup>b</sup>
<b>NC</b>	<b>GSH</b>	0	11,47 ± 3,20 <sup>a</sup>	18,24 ± 0,94 <sup>b</sup>	8,52 ± 1,79 <sup>a</sup>	5,34 ± 0,27 <sup>a</sup>	5,39 ± 0,27 <sup>a</sup>	5,54 ± 0,26 <sup>a</sup>
		8	7,56 ± 2,44 <sup>a</sup>	10,34 ± 1,91 <sup>b*</sup>	6,08 ± 0,33 <sup>a</sup>	4,93 ± 0,20 <sup>a</sup>	5,36 ± 0,28 <sup>a</sup>	4,68 ± 0,33 <sup>a</sup>
	<b>MDA</b>	0	98,42 ± 15,54	81,98 ± 10,85	94,89 ± 13,08	104,76 ± 11,15	120,58 ± 15,48	128,68 ± 15,49
		8	71,92 ± 6,06	114,14 ± 15,98	87,36 ± 9,82	88,89 ± 9,84	122,41 ± 13,43	107,18 ± 10,84
	<b>CP</b>	0	0,004 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,003 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,009 ± 0,002 <sup>ab</sup>	0,012 ± 0,001 <sup>b</sup>	0,011 ± 0,001 <sup>b</sup>	0,009 ± 0,001 <sup>b</sup>
		8	0,009 ± 0,003 <sup>a</sup>	0,004 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,006 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,008 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,012 ± 0,001 <sup>b</sup>	0,01 ± 0,001 <sup>b</sup>

LEGENDA: Animais expostos a temperatura (TE) de 0°C (controle) e de 8°C (experimentais) durante 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas. GSH expresso em  $\mu\text{mols}$  de tióis/mg de proteína; CP expresso em nanomols de carbonilas/mg de proteína e MDA expresso em  $\mu\text{mols}$  de equivalentes de MDA. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as temperaturas (teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ ). As letras diferentes indicam diferenças entre os tempos de exposição em 0°C e 8°C. Os dados estão expressos como média ± EPM (erro padrão da média).

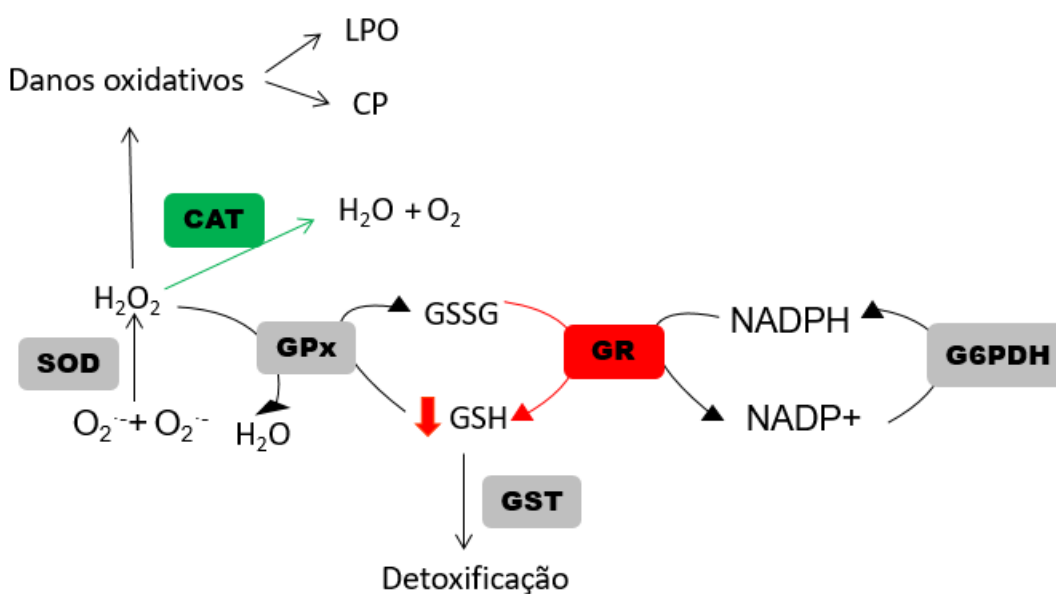
Nas figuras 21 e 22 segue a esquematização dos resultados obtidos dos marcadores da defesa antioxidante alterados frente o estresse térmico (8°C) de curto prazo (2 a 144 horas) no rim de *N. rossii* e *N. coriiceps*, respectivamente.

FIGURA 21 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE RENAL EM *Notothenia rossii* SUBMETIDOS AO ESTRESSE TÉRMICO



LEGENDA: CAT – Catalase; GPx – Glutathiona peroxidase; GR - Glutathiona redutase; GST – Glutathiona-S-transferase; G6PDH - Glicose-6-fosfato desidrogenase; SOD – Superóxido dismutase. Setas em vermelho: níveis de atividades reduziram; Setas em verde: níveis de atividade aumentaram; Setas pretas: sem alteração.

FIGURA 22 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE RENAL EM *Notothenia coriiceps* SUBMETIDOS AO ESTRESSE TÉRMICO



LEGENDA: CAT – Catalase; GPx – Glutathiona peroxidase; GR - Glutathiona redutase; GST – Glutathiona-S-transferase; G6PDH - Glicose-6-fosfato desidrogenase; SOD – Superóxido dismutase. Setas em vermelho: níveis de atividades reduziram; Setas em verde: níveis de atividade aumentaram; Setas pretas: sem alteração.

O resumo das alterações significativas dos dados do metabolismo de carboidratos e do estresse oxidativo decorrente do aquecimento mostradas no grupo experimental de 8°C quando comparadas com o grupo controle de 0°C, de *N. rossii* e *N. coriiceps* estão resumidas na tabela 9 a seguir.

TABELA 9 - RESUMO DAS ALTERAÇÕES ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS NO RIM DE *N. rossii* (NR) E *N. coriiceps* (NC) SUBMETIDOS AO ESTRESSE TÉRMICO (8°C)

		Rim	
	Parâmetro	NR	NC
Parâmetros metabólicos	Glicogênio	=	↑ 6h ↓ 12h
	Lactato	=	=
	Piruvato	=	↑ 6h ↓ 144h
Metabolismo de carboidratos	Hexoquinase	↑ 6h	↓ 2h
	Fosfofrutoquinase	↑ 6h ↓ 12h	=
	Citrato sintase	↓ 2h	↑ 24h
	Malato desidrogenase	=	=
	Lactato desidrogenase	=	=
	Glucose-6-fosfatase	↓ 12h	↓ 2, 72h, ↑ 12h
	Glucose-6-fosfato desidrogenase	=	=
Defesa antioxidante	Superóxido dismutase	=	=
	Catalase	↓ 12h	↑ 2 e 6h
	Glutathiona-S-transferase	↓ 2h	=
	Glutathiona peroxidase	↓ 2h	=
	Glutathiona redutase	↓ 2h	↓ 6, 12h
	Glucose-6-fosfato desidrogenase	=	=
	Glutathiona reduzida	=	↓ 6h
	Peroxidação lipídica	↓ 2h ↑ 72h	=
	Carbonilação proteica	=	=

LEGENDA: Animais expostos a 0°C (controle) e 8°C (experimentais) durante 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas. As setas indicam aumento (para cima) ou redução (para baixo) da atividade e o sinal de "=" indica que não foi observada alterações nos parâmetros analisados.

## 5 DISCUSSÃO

O sucesso da ictiofauna antártica, em um ambiente estável e de baixas temperaturas, suscita questionamentos a respeito da plasticidade dos organismos perante alterações térmicas. Considerando o indicativo do aumento da temperatura das águas superficiais em torno da Península Antártica é necessário compreender o efeito do aumento térmico nos organismos marinhos antárticos e suas consequências ecológicas. Os rins além de atuar na osmorregulação e excreção, apresentam importante papel na regulação metabólica, mantendo o suprimento energético de outros tecidos, o que parece ser uma importante estratégia frente ao aquecimento. A resposta a esse desafio traz como consequência modificações das taxas fisiológicas e da demanda energética nos organismos ectotérmicos (PÖRTNER, 2002), o que leva a ajustes compensatórios do metabolismo, dentre eles, a modulação das atividades de enzimas mitocondriais e glicolíticas (PÖRTNER, 2002), sendo a resposta espécie e tecido-específicas. Para isso, nesse trabalho, foram avaliados os efeitos do estresse térmico agudo no metabolismo energético de carboidratos e no sistema de defesa antioxidante renais dos nototenídeos antárticos *N. rossii* e *N. coriiceps*.

### 5.1 EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS RENAL

O metabolismo energético nos peixes é influenciado por uma variedade de fatores. Neste estudo, a temperatura, única variável testada, foi a responsável pelas mudanças apresentadas nos marcadores do metabolismo de carboidratos. A fim de minimizar os efeitos da alimentação, incluindo o jejum, nos marcadores do metabolismo intermediário (SANGIAO-ALVARELLOS et al., 2005; POLAKOF et al., 2006; POLAKOF; MÍGUEZ; SOENGAS, 2007), optou-se por alimentar os animais controle e experimentais (por ex.: 0 e 8°C - 2 horas) de forma idêntica. Assim, a energia fornecida através da alimentação não diferiu entre os animais controle e experimentais, e a constância do coeficiente de ação dinâmica específica, um parâmetro que é discutido por Johnston; Battram (1993), Boyce;

Clarke (1997), Secor (2009) e Vanella et al. (2010), não influenciou nossos resultados. A variabilidade observada nos dados dos animais-controle (0°C) ao longo do tempo pode ser decorrente do efeito da alimentação, já que os parâmetros do metabolismo energético que foram avaliados são altamente regulados pela disponibilidade de substrato. A alimentação pode aumentar a glicogenólise e o potencial gliconeogênico (SANGIAO-ALVARELLOS et al., 2005; POLAKOF et al., 2006; POLAKOF; MÍGUEZ; SOENGAS, 2007), aumentar a capacidade de exportação de glicose (METÓN et al., 2004; SANGIAO ALVARELLOS et al., 2005; POLAKOF; MÍGUEZ; SOENGAS, 2007) e diminuir a capacidade de fosforilação da glicose (POLAKOF et al., 2006; POLAKOF; MÍGUEZ; SOENGAS, 2007).

As mudanças nos níveis de atividades das enzimas do metabolismo de carboidratos indicam uma reorganização da maquinaria metabólica no rim de *N. rossii* frente ao estresse térmico de curto prazo. Nas primeiras horas de elevação da temperatura, houve uma tendência de redução (2 horas) e de aumento (6 horas) das enzimas glicolíticas e do ciclo do ácido cítrico refletindo um aumento da demanda por ATP tempo-dependente. A partir de 12 horas, as atividades enzimáticas reduzem novamente, com valores semelhantes aos do grupo controle até 144 horas, sugerindo uma estabilização entre a demanda energética e a produção de ATP no tecido renal, o que também foi observado em outros estudos, ao submeter peixes antárticos a elevadas temperaturas (PÖRTNER, 2002; STROBEL et al., 2013). A manutenção dos níveis de atividade de LDH e de lactato corrobora essa hipótese, já que indicam que não houve ativação do metabolismo anaeróbico frente ao estresse térmico. O estresse térmico também não alterou os níveis renais de glicogênio e diminuiu a atividade da G6Pase, em 12 horas, indicando que a glicose exógena pode ter sido o principal substrato energético utilizado por esse tecido em *N. rossii*.

Em relação ao metabolismo de carboidratos no rim de *N. coriiceps*, nas primeiras 2 horas, a elevação térmica resultou em uma redução da capacidade de fosforilação da glicose, evidenciado pela redução dos níveis de atividade da HK. A partir de 6h, não se observou diferença significativa nas enzimas da via glicolítica e do ciclo do ácido cítrico quando comparadas com o controle, ao longo do período experimental. Com estes resultados pode-se notar que em *N. coriiceps*, apesar de, nos tempos iniciais de exposição, a via glicolítica ter sido



afetada, o estresse térmico não alterou as vias de produção de energia, havendo um equilíbrio entre o consumo e a formação de energia no tecido renal. Os níveis renais de G6Pase e de glicogênio, em *N. coriiceps* variaram com o tempo de exposição, sendo que as concentrações de glicogênio diminuíram com o aumento da G6Pase, e vice-versa. A G6Pase catalisa a última etapa da via glicogenolítica, produzindo glicose, a partir da desfosforilação da glicose-6-fosfato, que pode ser exportada para a corrente sanguínea. Portanto, estes resultados indicam que a G6Pase apresenta importante papel no armazenamento e utilização de reservas glicogênicas teciduais. As flutuações na atividade da G6Pase e dos níveis de glicogênio foram decorrentes possivelmente da resposta a sinais hormonais sistêmicos de insulina e glucagon, cujos efeitos em peixes são semelhantes aos observados em mamíferos, com o glucagon estimulando a glicogenólise e a insulina estimulando a glicogênese (SUAREZ; MOMMSEN, 1987). Os níveis circulantes de insulina e glucagon, além de estarem relacionados ao estado nutricional do peixe, são influenciados pela temperatura (NAVARRO et al., 2002). Por exemplo, em *Cyprinus carpio* submetido ao estresse térmico (15-28°C), houve um aumento significativo nos níveis plasmáticos de glucagon, promovendo uma maior mobilização de glicogênio hepático (BLASCO et al., 1988).

## 5.2 EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO NO SISTEMA ANTIOXIDANTE RENAL

Com relação às defesas antioxidantes, no rim de *N. rossii*, o estresse térmico foi responsável pela redução de GPx, GR, GST (2 horas) e de CAT (12 horas). Essa redução é justificável, considerando que o sistema antioxidante de peixes pode sofrer uma depleção após ser submetido a temperaturas críticas máxima (CTmax), decorrente de desnaturação e degradação de proteínas (MADEIRA et al., 2013) e consequente redução da síntese proteica. Embora as temperaturas utilizadas nesse estudo sejam menores que as CTmax de ambas as espécies estudadas (16,16°C para *N. rossii* e 16,17°C para *N. coriiceps*), a alteração na temperatura pode ter contribuído para a inibição nas atividades enzimáticas (BILYK e DEVRIES, 2011).

A GR é uma enzima que não atua diretamente na remoção de EROs, mas é responsável pela regeneração de GSH, a partir de GSSG, na presença de NADPH (ROVER JUNIOR et al., 2001). A GSH, por sua vez, pode atuar como antioxidante ou cofator para as enzimas GSH-dependentes (SK; BHATTACHARYA, 2006). A redução nos níveis de atividade da GR pode ter contribuído com uma tendência de redução do conteúdo de GSH renal em 2 horas, o que pode corroborar a redução de GPx e GST, tornando as células mais suscetíveis a danos oxidativos. De fato, observou-se um aumento na LPO no rim de *N. rossii* submetidos ao estresse térmico. A LPO é caracterizada por reações em cadeia de espécies reativas de oxigênio, em especial, o radical hidroxila, com fosfolipídios de membranas, principalmente ácidos graxos poliinsaturados (PUFA). Esse processo forma intermediários extremamente reativos, que podem comprometer as funções biológicas das membranas e o funcionamento celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Esse elevado índice de LPO é esperado para peixes antárticos sob estresse oxidativo, tendo em vista o elevado nível de ácidos graxos mono e poliinsaturados nesses animais (SIDEELL, 1998), alvos do processo de LPO.

*N. coriiceps* submetidos a 8°C mostraram um aumento da atividade da CAT renal em relação ao controle (0°C), sendo possivelmente consequência de um aumento na produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e da necessidade de sua eliminação no tecido avaliado. Os níveis de GR diminuíram com o estresse térmico nas primeiras 12 horas com consequente redução dos níveis de GSH. É provável que a GSH foi consumida para a eliminação de EROs geradas no tecido nas primeiras horas de estresse térmico e como consequência da inibição da GR. Nos tempos de exposição subsequentes, os níveis de GSH retornam aos valores do grupo controle, sendo, juntamente com a ação das defesas antioxidantes enzimáticas, um dos elementos mais importantes para a proteção do tecido contra os danos oxidativos decorrentes do estresse térmico.

## 6 CONCLUSÕES

Nossos resultados demonstram que o estresse térmico promoveu alterações no metabolismo energético de carboidratos e no sistema de defesa antioxidante renal de *N. rossii* e *N. coriiceps*, sendo espécie e tempo dependentes. O rim é um tecido que tem importante papel na regulação metabólica, sendo que, a manutenção do suprimento energético de outros tecidos parece ser uma estratégia metabólica fundamental frente o estresse térmico. As diferenças nas respostas apresentadas por *N. rossii* e *N. coriiceps* submetidas ao estresse térmico de curto prazo podem ser justificadas por diferenças genotípicas específicas para cada espécie. Desta forma, os resultados obtidos sugerem que os rins de *N. rossii* e *N. coriiceps* conseguiram estabilizar a demanda energética e manter o metabolismo aeróbico frente o estresse térmico. Além de possuírem um sistema antioxidante eficiente capaz de evitar danos oxidativos decorrentes do estresse térmico, especialmente em *N. coriiceps*.

O presente estudo contribui ainda para a compreensão da sensibilidade térmica, os mecanismos celulares e as implicações dos custos energéticos frente a mudanças da temperatura ambiental em peixes polares que são adaptados a temperaturas baixas e estáveis. Além disso, nossos resultados podem servir como parâmetros de referência para futuras avaliações das espécies analisadas, tendo em vista que todos os indivíduos sobreviveram durante o período de aclimação e foram capazes de estabilizar a demanda energética.

## REFERÊNCIAS

- ABELE, D.; PUNTARULO, S. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 138, p. 405–415, 2004.
- ANSALDO, M.; LUQUET, C.M.; EVELSONN, P.A.; POLO, J.M.; LLESUY, S. Antioxidant levels from different antarctic fish caught around South Georgia Island and Shag Rocks. **Polar Biology**, v.23, p.160-165, 2000.
- BAGNYUKOVA, T. V.; STOREY, K. B.; LUSHCHAK, V. I. Induction of oxidative stress in *Rana ridibunda* during recovery from winter hibernation. **Journal of Thermal Biology**, v. 28, p. 21-28, 2003.
- BALDWIN, J.; ELIAS, J. P.; WELLS, R. M. G.; DONOVAN, D. A. Energy metabolism in the tropical abalone, *Haliotis asinina* Linné: comparisons with temperate abalone species. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 342, p. 213–225, 2007.
- BARRERA-ORO, E. R. Review: the role of fish in the Antarctic marine food web: differences between inshore and offshore waters in the southern Scotia Arc and west Antarctic Peninsula. **Antarctic Science**, v. 14, p.293–309, 2002.
- BARTON, B.A. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, v.42 n.3, p.517-525, 2002.
- BEUTLER, E. **Red cell metabolism: a manual of biochemical methods**. New York: Grune & Stratton, p.160, 1975.
- BIDINOTO, P.M.; SOUZA, R.H.S.; MORAES, G. Hepatic glycogen in eight tropical freshwater teleost fish: Procedure for field determinations of microsamples. **Boletim Técnico do CEPTA-Pirassununga**, v. 10, p. 53-60, 1997.
- BILYK, K.T.; DEVRIES, A. L. Heat tolerance and its plasticity in Antarctic fishes. **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**, v.158, n.4, p.382-90, 2011.
- BLASCO, J.; GUTIÉRREZ, J.; FERNÁNDEZ, J.; PLANAS, J. The effect of temperature on immunoreactive glucagon plasma level in carp *Cyprinus carpio*. **Revista Espanola de Fisiología**, v. 44, p. 157–162, 1988.
- BOYCE, S. J.; CLARKE, A. Effect of body size and ration on specific dynamic action in the Antarctic plunderfish, *Harpagifer antarcticus* Nybelin 1947. **Physiological Zoology**, v. 70, p. 679-690, 1997.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of rotein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BURCHET, M.S. Morphology and morphometry of the Antarctic Nototheniid *Notothenia rossii marmorata*. **Bulletin British Antarctic Survey**, v. 58, p.71–81, 1983.

CAMPBELL, H. A.; FRASER, K. P. P.; BISHOP, C. M.; PECK, L. S.; EGGINTON, S. Hibernation in an Antarctic fish: on ice for winter. **PLoS ONE**, v. 3, p. e1743, 2008.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 250, p.5475–5480, 1975.

CARNEY ALMROTH, B.; ASKER, N.; WASSMUR, B.; ROSENGREN, M.; JUTFELT, F.; GRÄNS, A.; SUNDELL, K.; AXELSSON, M.; STURVE, J. Warmer water temperature results in oxidative damage in an antarctic fish, the bald notothen. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 468, p. 130–137, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jembe.2015.02.018>>.

CHILDRESS, J. J.; SOMERO, G. N. Depth-related enzymic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts. **Marine Biology**, v. 52, n.3, p. 273-283, 1979.

CIARDELLO, M.; CAMARDELLA, L.; DI PRISCO, G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase from the blood cells of two Antarctic teleosts: correlation with cold adaptation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1250, p. 76–82, 1995.

CORBISIER, T. N.; PETTI, M. A. V.; SKOWRONSKI, R. S. P.; BRITO, T. A. S. Trophic relationships in the nearshore zone of Martel Inlet (King George Island, Antarctica): d13C stableisotope analysis. **Polar Biology**, v. 27, p. 75-82, 2004.

CROUCH, R.K.; GANDY, S.C.; KINSEY, G. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. **Diabetes**, v. 30, p. 235-241, 1981.

CULLINS, T.L.; DE VRIES, A.L.; TORRES, J.J. Antifreeze proteins in pelagic fishes from Marguerite Bay (Western Antarctica). **Deep-Sea Research II**, v. 58, p.1690-1694, 2011.

DONATTI, L.; FANTA, E. Influence of photoperiod on visual prey detection in the Antarctic fish *Notothenia neglecta* Nybelin. **Antarctic Science** v. 14, p. 146–150, 2002.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p.350-358, 1956.

ENGELUND, M. B.; MADSEN, S. S. The role of aquaporins in the kidney of euryhaline teleosts. **Frontiers in Physiology**, v. 2, p. 51, 2011.

ENZOR, L. A.; PLACE, S. P. Is warmer better? Decreased oxidative damage in notothenioid fish after long-term acclimation to multiple stressors. **Journal of Experimental Biology**, v. 217, n. 18, p. 3301–3310, 2014. Disponível em: <<http://jeb.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jeb.108431>>.

FATHI, A. R.; KRAUTHEIM, A.; LUCKE, S.; BECKER, K.; STEINFELDE, R. H. J. Nonradioactive technique to measure protein phosphatase 2A-like activity and its inhibition by drugs in cell extracts. **Analytical Biochemistry**, v. 310, n. 2, p. 208–214, 2002.

FEDERICI, G.; SHAW, B.J., HANDY, R.D. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. **Aquatic Toxicology**, v. 84, p. 415–430, 2007.

GIESEG, S. P.; CUDDIHY, S.; HILL, J. V.; DAVISON, W. A comparison of plasma vitamin C and E levels in two Antarctic and two temperate water fish species. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 125, p. 371–378, 2000.

GIROTTI, A. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. **The Journal of Lipid Research**, v. 39, p.1529–1642, 1998.

GRIM, J. M.; Simonik, E. A.; Semones, M. C.; Kuhn, D. E.; Crockett, E. L. The glutathione-dependent system of antioxidant defense is not modulated by temperature acclimation in muscle tissues from striped bass, *Morone saxatilis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 164, n. 2, p. 383–390, 2013.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, Oxford, 2007.

HARROWER, J.R.; BROWN, C.H. Blood lactic acid. A micromethod adaptes to field collection of microliter samples. **Journal of Applied Physiology**, v. 32, p. 224–228, 1972.

HOCHACHKA, P.W.; SOMERO, G. N. **Biochemical adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution**. New York: Oxford University Press, 2002.

HUNT, B. M.; HOEFLING, K.; CHENG, C. H. C. Annual warming episodes in seawater temperatures in McMurdo Sound in relationship to endogenous ice in notothenioid fish. **Antarctic Science**, v.15, p. 333–338, 2003.

JAYASUNDARA, N.; HEALY, T. M.; SOMERO, G. N. Effects of temperature acclimation on cardiorespiratory performance of the Antarctic notothenioid *Trematomus bernacchii*. **Polar Biology**, v. 36, n. 7, p. 1047–1057, 2013.

JIN, Y.; DE VRIES, A.L. Antifreeze glycoprotein levels in Antarctic notothenioid fishes inhabiting different thermal environments and the effect of warm acclimation. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v.144, n.3, p.290-300, 2006.

JOHNSTON, I. A.; BATTRAM, J. Feeding energetics and metabolism in demersal fish species from Antarctic, temperate and tropical environments. **Marine Biology**, v.115, p.7-14, 1993.

KEEN, J.H.; HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. Mechanism for Several Activities of the Glutathione S transferases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, p. 6183-6188, 1976.

KING J.C.; HARANGOZO, S.A. Climate change in the western Antarctic Peninsula since 1945: observations and possible causes. **Annals of Glaciology**, v. 27, p. 571-575, 1998.

KNOX, G. A. The biology of the Southern Ocean. Cambridge University Press, Cambridge, p. 444, 1994.

LANNIG, G.; STORCH, D.; PÖRTNER, H. O. Aerobic mitochondrial capacities in Antarctic and temperate eelpout (Zoarcidae) subjected to warm versus cold acclimation. **Polar Biology**, v. 28, p. 575-584, 2005.

LEVINE, R. L.; WILLIAMS, J. A.; STADTMAN, E. P.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 233, p. 346-357, 1994.

LU, G. D. The metabolism of pyruvic acid in normal and vitamin B-deficient state. I. A rapid specific and sensitive method for the estimation of blood pyruvate. **Biochemical Journal**, v. 33, p. 249-254, 1939.

MACHADO, C.; ZALESKI, T.; RODRIGUES, E.; CARVALHO, C. dos S.; CADENA, S. M. S. C.; GOZZI, G. J.; KREBSBACH, P.; RIOS, F. S. A.; DONATTI, L. Effect of temperature acclimation on the liver antioxidant defence system of the Antarctic nototheniids *Notothenia coriiceps* and *Notothenia rossii*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 172-173, n. 1, p. 21-28, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2014.02.003>>.

MADEIRA, D.; NARCISO, L.; CABRAL, H. N.; VINAGRE, C.; DINIZ, M. S. Influence of temperature in thermal and oxidative stress responses in estuarine fish. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 166, p. 237-243, 2013.

MARK, F. C.; BOCK, C.; PÖRTNER, H. O. Oxygen-limited thermal tolerance in Antarctic fish investigated by MRI and <sup>31</sup>P-MRS. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 283, p.R1254-R1262, 2002.

MARK, F. C.; LUCASSEN, M.; PÖRTNER, H. O. Thermal sensitivity of uncoupling protein expression in polar and temperate fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part D**, v. 1, p. 365–374, 2006.

MARSHALL, W. S.; GROSELL, M. Ion transport, osmoregulation, and acid-base balance. **The Physiology of fishes**, v. 3, p. 177-230, 2006.

MÉTON, I.; CASERAS, A.; FERNÁNDEZ, F.; BAANANTE, I.V. Molecular cloning of hepatic glucose-6-phosphatase catalytic subunit from gilthead sea bream (*Sparus aurata*): response of its mRNA levels and glucokinase expression to refeeding and diet composition. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 138, p.145–153, 2004.

MINTENBECK, K.; BARRERA-ORO, E. R.; BREY, T.; JACOB, U.; KNUST, R.; MARK, F. C.; MOREIRA, E.; STROBEL, A.; ARNTZ, W. E. **Impact of Climate Change on Fishes in Complex Antarctic Ecosystems**. In: Global change in multispecies systems, v. 46, Elsevier, 2012. p. 351-426.

MUELLER, I. A.; DEVOR, D. P.; GRIM, J. M.; BEERS, J. M.; CROCKETT, E. L.; O'BRIEN, K. M. Exposure to critical thermal maxima increases oxidative stress in hearts of whitebut not red-blooded Antarctic notothenioid fishes. **Journal of Experimental Biology**, 215 (20): 3655-3664, 2012.

NAVARRO, I.; ROJAS, P.; CAPILLA, E.; ALBALAT, A.; CASTILLO, J.; MONTSERRAT, N.; CODINA, M.; GUTIÉRREZ, J. Insights into insulin and glucagon responses in fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, 27: 205–216, 2002.

NEAR T. J.; PESAVENTO, J. J.; CHENG, C. H. C. Phylogenetic investigations of Antarctic notothenioid fishes (Perciformes: Notothenioidei) using complete gene sequences of the mitochondrial encoded 16 S rRNA. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 32, p.881–891, 2004. Disponível em: <10.1016/j.ympev.2004.01.002>.

O'GRADY, S.M.; DE VRIES, A.L. Osmotic and ionic regulation in polar fishes. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.57, p.219-228, 1982.

PODRABSKY, J. E.; SOMERO, G. N. Inducible heat tolerance in Antarctic notothenioid fishes. **Polar Biology**, v.30, n.1, p.39-43, 2006.

POLAKOF, S.; ARJONA, F. J.; SANGIAO-ALVARELLOS, S.; MARTÍN DEL RÍO, M. P.; MANCERA, J. M.; SOENGAS, J. L. Food deprivation alters osmoregulatory and metabolic responses to salinity acclimation in gilthead sea bream *Sparus auratus*. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 176, p. 441-452, 2006.

POLAKOF, S.; MÍGUEZ, J. M.; SOENGAS, J. L. Daily changes in parameters of energy metabolism in liver, white muscle, and gills of rainbow trout: dependence on feeding. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 147, p. 363–374, 2007.



PÖRTNER, H.O. Climate change and temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchies of thermal tolerance in animals. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v.132, p.739-761, 2002.

PÖRTNER, H. O.; LANGENBUCH, M.; MICHAELIDIS, B. Synergistic effects of temperature extremes, hypoxia and increases in CO<sub>2</sub> on marine animals: from Earth history to global change. **Journal of Geophysical Research**, v. 110, p.C09S10, 2005.

PÖRTNER, H.-O. Oxygen- and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems. **Journal of Experimental Biology**, v. 213, n. 6, p. 881–893, 2010. Disponível em: <<http://jeb.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jeb.037523>>.

RAGA, G.; PICHLER, H. A.; ZALESKI, T.; DA SILVA, F. B. V.; MACHADO, C.; RODRIGUES, E.; KAWALL, H. G.; RIOS, F. S.; DONATTI, L. Ecological and physiological aspects of the antarctic fishes *Notothenia rossii* and *Notothenia coriiceps* in Admiralty Bay, Antarctic Peninsula. **Environmental Biology of Fishes**, v. 98, n. 3, p. 775–788, 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10641-014-0311-2>>.

ROBINSON, E. Antarctic fish: thermal specialists or adaptable generalists? PhD Thesis, University of Canterbury, 2008.

RODRIGUES, E.; SUDA, C.N.K.; RODRIGUES, E. JR.; DE OLIVEIRA, M.F.; DOS SANTOS CARVALHO, C.; VANI, G.S. Antarctic fish metabolic responses as potential biomarkers of environmental impact. **Oecologia Australis**, v. 15, n. 1, p. 124-149, 2011.

RODRIGUES, E.; FEIJÓ-OLIVEIRA, M.; VANI, G. S.; SUDA, C. N. K.; CARVALHO, C. S.; DONATTI, L.; LAVRADO, H. P.; RODRIGUES, E. Interaction of warm acclimation, low salinity, and trophic fluoride on plasmatic constituents of the Antarctic fish *Notothenia rossii* Richardson, 1844. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 6, p. 1591–1601, 2013.

RODRIGUES, E.; FEIJÓ-OLIVEIRA, M.; SUDA, C. N. K.; VANI, G. S.; DONATTI, L.; RODRIGUES, E.; LAVRADO, H. P. Metabolic responses of the Antarctic fishes *Notothenia rossii* and *Notothenia coriiceps* to sewage pollution. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1205–1220, 2015.

ROVER JR, L.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, 24(1): 112-119, 2001.

RYAN, S. N. The effect of chronic heat stress on cortisol levels in the Antarctic fish *Pagothenia borchgrevinki*. **Experientia**, v. 51, n. 8 p. 768–774, 1995.

SABOROWSKI, I.R.; BUCHHOLZ, F. Metabolic properties of Northern krill, *Meganyctiphanes norvegica*, from different climatic zones. II. Enzyme characteristics and activities. **Marine Biology**, v.140, n.3, p.557-565, 2002.

SANGIAO ALVARELLOS, S.; GUZMÁN, J. M.; LÁIZ-CARRIÓN, R.; MÍGUEZ, J. M.; MARTÍN DEL RÍO, M. P.; MANCERA, J. M.; SOENGAS, J. L. Interactive effects of the high stocking density and food deprivation on carbohydrate metabolism in several tissues of gilthead sea bream *Sparus auratus*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 303, p.761–775, 2005.

SECOR, S. M. Specific dynamic action: a review of the postprandial metabolic response. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 179, p. 1–56, 2009.

SEDILAK, J.; LINDSAY, R.H.C. Estimation of total, protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellmann's reagent. **Analytical Biochemistry**, 25: 192–205, 1968.

SIDELL, B.D. Intracellular oxygen diffusion: the roles of myoglobin and lipid at cold body temperature. **Journal of Experimental Biology**, 201:1118–1127, 1998.

SK, U.H.; BHATTACHARYA, S. Prevention of cadmium induced lipid peroxidation, depletion of some antioxidative enzymes and glutathione by series of novel organoselenocyanates **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 22:298–308, 2006.

SMITH, R.N. The freezing resistance of antarcti fish: I Serum composition and its relation to freezing resistance. **British Antarctic Survey Bulletin**, p.1-10, 1972.

STROBEL, A.; BENNECKE, S.; LEO, E.; MINTENBECK, K.; PÖRTNER, H. O.; MARK, F. C. Metabolic shifts in the Antarctic fish *Notothenia rossii* in response to rising temperature and PCO<sub>2</sub>. **Frontiers in Zoology**, v. 9, n. 1, p. 28, 2012.

STROBEL, A.; LEO, E.; PÖRTNER, H. O.; MARK, F. C. Elevated temperature and PCO<sub>2</sub> shift metabolic pathways in differentially oxidative tissues of *Notothenia rossii*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**. 10p, 2013.

SUAREZ, R.K.; MOMMSEN, T.P. Gluconeogenesis in teleost fishes. **Canadian Journal of Zoology**, 65: 1869-1882, 1987.

THUESEN, E. V.; MCCULLOUGH, K. D.; CHILDRESS, J. J. Metabolic enzyme activities in swimming muscle of medusae: is the scaling of glycolytic activity related to oxygen availability? **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v.85, n.3, p.603-611, 2005.

TSENG, Y. C.; HWANG, P. P. Some insights into energy metabolism for osmoregulation in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 148, n. 4, p. 419-429, 2008.

TURNER, J.; COLWELL, S.R.; MARSHALL, G.J.; LACHLAN-COPE, T.A.; CARLETON, A.M.; JONES, P.D.; LAGUN, V.; REID, P.A.; IAGOVKINA, A. S. Antarctic climate change during the last 50 years. **International Journal of Climatology**, v.25, p.279-294, 2005.

TURNER, J.; BARRAND, N.E.; BRACEGIRDLE, T.J.; CONVEY, P.; HODGSON, D.A.; JARVIS, M.; JENKINS, A.; MARSHALL, G.; MEREDITH, M.P.; ROSCOE, H.; SHANKLIN, J.; FRENCH, J.; GOOSSE, H.; GUGLIELMIN, M.; GUTT, J.; JACOBS, S.; KENNICUTT, M.C.; MASSON-DELMOTTE, V.; MAYEWSKI, P.; NAVARRO, F.; ROBINSON, S.; SCAMBOS, T.; SPARROW, M.; SUMMERHAYES, C.; SPEER, K.; KLEPIKOV, A. Antarctic climate change and the environment: an update. **Polar Record**, 50(3): 237-259. doi: 10.1017/S0032247413000296, 2014.

VAN DIJK, P. L. M.; TESCH, C.; HARDEWIG, I.; PÖRTNER, H. O. Physiological disturbances at critically high temperatures: a comparison between stenothermal Antarctic and eurythermal temperate eelpouts (Zoarcidae). **Journal of Experimental Biology**, v. 202, p.3611–3621, 1999.

VANELLA, F. A.; BOY, C. C.; LATTUCA, M. E.; CALVO, J. Temperature influence on post-prandial metabolic rate of sub-Antarctic teleost fish. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, v. 156, n. 2, p. 247–254, 2010.

VINAGRE, C.; MADEIRA, D.; NARCISO, L.; CABRAL, H. N.; DINIZ, M. Effect of temperature on oxidative stress in fish: Lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*. **Ecological Indicators**, 23: 274–279, 2012.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*. 77: p.325-333, 1981.

WINDISCH, H.S.; FRICKENHAUS, S.; JOHN, U.; KNUST, R.; PÖRTNER, H.O.; LUCASSEN, M. Stress response or beneficial temperature acclimation: transcriptomic signatures in Antarctic fish (*Pachycara brachycephalum*). **Molecular Ecology**, v.23, 3469–3482, 2014.

## CAPÍTULO III

### O efeito do estresse térmico de curto prazo no perfil bioquímico plasmático de nototenídeos antárticos

#### RESUMO

Espécies antárticas apresentam certa plasticidade frente a elevações térmicas, no entanto, os mecanismos envolvidos na restauração da homeostase ainda não são bem compreendidos. Por isso, este estudo verificou os efeitos fisiológicos do estresse térmico (8°C) de curto prazo (2 a 144h) no plasma de *Notothenia coriiceps* e *Notothenia rossii*, espécies abundantes na Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Península Antártica, região onde há registros de aumento de temperatura. As espécies, apesar de filogeneticamente próximas, responderam de forma distinta ao estresse térmico. Em *N. rossii*, o aumento térmico não alterou os níveis de cortisol, e a hiperglicemia transiente provavelmente foi desencadeada pela elevação dos níveis de catecolaminas, enquanto os demais parâmetros metabólicos (triglicerídeos, colesterol, lactato desidrogenase, piruvato, proteínas totais, albumina e globulinas), iônicos (cloreto, cálcio e fósforo) e da defesa antioxidante (superóxido dismutase e catalase) não foram afetados. Para *N. coriiceps*, o cortisol é um bom biomarcador de estresse térmico, o qual desencadeou as respostas secundárias pontuais como a hiperglicemia e hiperlactemia, bem como a redução dos níveis de proteína total, de globulina e de triglicerídeos. Apenas em *N. rossii*, observou-se o aumento da atividade da Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase branquial a partir de 24h em 8°C, contribuindo assim, para a homeostase iônica. Diferente de *N. rossii*, em *N. coriiceps*, a enzima antioxidante catalase foi modulada em 8°C, sendo considerada um bom biomarcador de estresse térmico. Diante dos resultados obtidos neste trabalho sugere-se que *N. coriiceps* apresenta maior sensibilidade térmica que *N. rossii*, verificada pelas diferentes respostas desencadeadas frente ao estresse térmico, podendo ser indicada como um bioindicador da Baía Almirantado.

Palavras-chave: Peixes antárticos. Metabolismo. Bioindicadores bioquímicos. Temperatura. Baía do Almirantado.

Artigo referente ao presente capítulo:

Kandalski, P.K.; De Souza, M.R.D.; Herrerias, T.; Machado, C.; Zaleski, T.; Forgati, M.; Guillen, A. C.; Viana, D.; Moura, M. O.; Donatti, L. Effects of short-term thermal stress on the plasma biochemical profiles of two Antarctic nototheniid species. Submetido para publicação na revista **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, no dia 23 de janeiro de 2018.

## 1 INTRODUÇÃO

A subordem Notothenioidei é considerada altamente estenotérmica (SOMERO; DE VRIES, 1967; PÖRTNER, 2006) habitando as águas frias e estáveis (-1,8 a +3°C) do oceano Antártico há cerca de 10-12 milhões de anos (EASTMAN, 1993; PODRABSKY; SOMERO, 2006). Entretanto, estudos climáticos indicam um aumento da temperatura do ar (VAUGHN et al., 2003) e das águas superficiais ao redor da Península Antártica desde a metade do século XX (MEREDITH; KING, 2005; TURNER et al., 2014). Além disso, o aquecimento das águas mais profundas do oceano pode ser acelerado pelas interações entre correntes marinhas, transporte de calor oceânico e ventos (COOK et al., 2016; GODDARD et al., 2017; SPENCE et al., 2017).

Peixes antárticos apresentam uma variedade de adaptações fisiológicas ao frio como a alta densidade mitocondrial, o elevado conteúdo lipídico (JOHNSTON et al., 1998; VERDE et al., 2006) e os altos níveis iônicos de Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> sanguíneos (GONZALEZ-CABRERA et al., 1995). Contudo, a flexibilidade das espécies antárticas para suportar elevações térmicas ainda não é bem compreendida. Por isso, especial atenção tem sido dada a respeito da habilidade de aclimação de peixes antárticos em temperaturas elevadas, já que, quando submetidos a desafios térmicos exibem respostas fisiológicas parciais à aclimação, como alterações das taxas metabólica de repouso, cardíaca e de crescimento; do consumo máximo de oxigênio; da composição lipídica e da atividade enzimática, fatores que podem explicar a limitada plasticidade térmica de nototenídeos antárticos (JAYASUNDARA et al., 2013; MUELLER et al., 2013; MACHADO et al., 2014; CARNEY ALMROTH et al., 2015; EGGINTON; CAMPBELL, 2016; ENZOR et al., 2017; FORGATI et al., 2017; KLEIN et al., 2017; SANDERSFELD; MARK; KNUST et al., 2017; SOUZA et al., 2018).

Alterações térmicas podem desencadear respostas ao estresse que têm como objetivo a manutenção ou o restabelecimento da homeostase e envolvem a alteração de diferentes processos celulares. O aumento dos níveis plasmáticos dos hormônios corticoides e das catecolaminas é considerado a resposta primária ao estresse. Entretanto, a liberação do cortisol é mais lenta que a das catecolaminas, apresentando efeitos mais duradouros (WARING et al., 1996)

que por sua vez desencadeiam as respostas secundárias ao estresse em diversos órgãos-alvo (MOMMSEN et al., 1999; BARTON, 2002). Assim, há a rápida mobilização das reservas energéticas levando a hiperglicemia, depleção das reservas teciduais de glicogênio, lipólise, inibição da síntese proteica e a alteração de enzimas marcadoras do metabolismo de carboidratos como a lactato desidrogenase (LDH) (MOMMSEN et al., 1999; Barton, 2002; Cheng et al., 2017). Além disso, o cortisol cumpre importante papel na osmorregulação através do seu efeito na estimulação da atividade da  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  e redução da osmolalidade sérica resultante da perda de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , como observado no peixe antártico *Trematomus bernacchii* submetido a 4°C (GONZALEZ-CABRERA et al., 1995; GUYNN et al., 2002; PETZEL, 2005).

Altos níveis constitutivos de enzimas antioxidantes são característicos de peixes antárticos em relação às espécies de ambiente temperado, como consequência da sua adaptação ao frio (CHEN et al., 2008). Entretanto, a elevação térmica também é fator de estresse para esses organismos levando-os a produzir mais espécies reativas de oxigênio (EROs) e consequentemente tornam-se mais vulneráveis às injúrias oxidativas (PÖRTNER, 2002; ABELE; PUNTARULO, 2004; MUELLER et al., 2011). As enzimas antioxidantes, superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), eliminam diretamente as EROs, apresentando papel fundamental para a proteção das células e para a manutenção da homeostase oxidativa (ABELE; PUNTARULO, 2004). Esses e outros marcadores de defesa antioxidante, enzimáticos e não-enzimáticos, já foram avaliados em alguns estudos envolvendo peixes antárticos e elevação térmica e os resultados encontrados tem grande variação entre espécies, tecidos e tempo de exposição (MUELLER et al., 2011; 2012; MACHADO et al., 2014; CARNEY ALMROTH et al., 2015; FORGATI et al., 2017; KLEIN et al., 2017; SOUZA et al., 2018).

Os parâmetros bioquímicos e da defesa antioxidante sanguíneos de peixes teleósteos são importantes ferramentas para a interpretação do estresse térmico (RYAN, 1995; Lowe; DAVISON, 2005; LU et al., 2016; CHENG et al., 2017; KLEIN et al., 2017; ROSSI et al., 2017; ZAFALON-SILVA et al., 2017). Esses parâmetros podem ser utilizados para o monitoramento do estado metabólico e mineral dos peixes, já que fornecem subsídios para a avaliação

indireta do funcionamento do organismo. Na literatura, são escassos os trabalhos avaliando parâmetros plasmáticos de *Notothernia coriiceps* e *Notothernia rossii* frente ao estresse térmico (HEISE; ABELE, 2008; RODRIGUES et al., 2013). Entretanto, quando outras espécies de nototenídeos antárticos são submetidas ao choque térmico observam-se diferentes padrões de alterações nos parâmetros plasmáticos, como o cortisol (RYAN, 1995; HUDSON et al., 2008), a glicemia (LOWE; DAVISON, 2005), o lactato (HEISE; ABELE, 2008; BEERS; SIDDELL, 2011; DEVOR et al., 2016) e os íons magnésio (PETZEL, 2005), cloreto e sódio (GONZALEZ-CABRERA, 1995; GUYNN et al., 2002). Demonstrando que algumas espécies de peixes antárticos não perderam a habilidade de induzir respostas compensatórias a fim de ajustar seu metabolismo frente a novas demandas energéticas. Possibilitando, assim, evitar o acúmulo de radicais livres, a degradação de proteínas e a depleção das reservas energéticas (ROSSI et al., 2017), ao menos pelos tempos e temperaturas experimentais testados.

As espécies analisadas neste estudo (*N. coriiceps* e *N. rossii*) são abundantes na Baía do Almirantado (KULESZ, 1999; RAGA et al., 2015), que está localizada na Ilha Rei George, Área Antártica Especialmente Gerenciada (ASMA No. 1) (BRAUN et al., 2001; ARIGONY-NETO et al., 2004), pertencente as Ilhas Shetland do Sul, Península Antártica, Antártica. Apesar de ecológica- (RAGA et al., 2015) e filogeneticamente (NEAR et al., 2004) similares apresentam respostas espécie, tecido e tempo-dependentes frente ao estresse térmico (MACHADO et al., 2014; FORGATI et al., 2017; SOUZA et al., 2018). Dessa forma, considerando a diferente plasticidade metabólica dos nototenídeos antárticos, o presente estudo teve como objetivo investigar a influência do estresse térmico (8°C) a curto prazo (2-144h) nos processos fisiológicos de *N. coriiceps* e *N. rossii* através da análise do perfil bioquímico e antioxidante plasmático. Além de indicar os biomarcadores plasmáticos que refletem o status metabólico tecidual frente às condições de temperatura e tempo nas duas espécies polares.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Avaliar as respostas fisiológicas, metabólicas e antioxidantes no plasma dos nototenídeos antárticos, *N. coriiceps* e *N. rossii*, submetidos ao estresse térmico (8°C) de curto prazo (2 a 144h).

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Determinar a variação do parâmetro endócrino plasmático: cortisol de *N. coriiceps* e *N. rossii*, submetidos ao estresse térmico (8°C) de curto prazo (2 a 144h).
- Mensurar os parâmetros metabólicos plasmáticos: glicose, triglicerídeos, colesterol, lactato desidrogenase, piruvato, lactato, proteína total, albumina e globulinas de *N. coriiceps* e *N. rossii*, submetidos ao estresse térmico (8°C) de curto prazo (2 a 144h).
- Avaliar os parâmetros iônicos plasmáticos: magnésio, cálcio, cloreto e fósforo inorgânico de *N. coriiceps* e *N. rossii*, submetidos ao estresse térmico (8°C) de curto prazo (2 a 144h).
- Avaliar as variações nas atividades dos marcadores da defesa antioxidante plasmáticos: superóxido dismutase e catalase de *N. coriiceps* e *N. rossii*, submetidos ao estresse térmico (8°C) de curto prazo (2 a 144h).
- Mensurar a variação da atividade Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase nos rins de *N. coriiceps* e *N. rossii* submetidos ao estresse térmico (8°C) de curto prazo (2 a 144h).



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 DECLARAÇÃO DE ÉTICA

O trabalho foi executado de acordo com a ética e regras das leis brasileiras e do Tratado Antártico. O Ministério do Meio Ambiente concedeu a licença ambiental e o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Paraná (CEUA - UFPR) sob os n° 496/2010 e 840/2014.

#### 3.2 COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS E ARRANJO EXPERIMENTAL

*N. coriiceps* ( $n = 116$ ; comprimento total (CT) =  $38 \pm 4$  cm; peso =  $778 \pm 243$  g) e *N. rossii* ( $n = 118$ ; CT =  $34 \pm 3$  cm; peso =  $443 \pm 134$  g) foram capturados com linha e anzol em profundidades entre 10 e 25 m em Punta Plaza ( $62^{\circ}05'64.5''$  S;  $58^{\circ}24'31.7''$  W) e Glaciar Ecology ( $62^{\circ}10'65''$  S;  $58^{\circ}26'5''$  W) na Baía do Almirantado. Na Estação Antártica Comandante Ferraz, foram colocados em tanques controle de 1000 litros localizados no laboratório de triagem com aeração constante, fotoperíodo de 12 h luz/ 12 h escuro, temperatura entre  $-0.5$  a  $1.0^{\circ}\text{C}$  e salinidade de  $35 \pm 1.0$  psu por 3 dias a fim de permitir a recuperação de qualquer estresse causado pela captura e transporte. Após este período os animais foram aclimatados por 3 dias nos laboratórios experimentais (RYAN, 1995; MACHADO et al., 2014) sob as mesmas condições abióticas que as do laboratório de triagem, entretanto com um controle mais rigoroso da temperatura ( $0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ). Após a aclimação, os peixes foram selecionados aleatoriamente, marcados com linhas coloridas na nadadeira dorsal e, transferidos para tanques de 1000 litros contendo água do mar com temperatura a  $8 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  (experimental) ou a  $0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  (controle) por 2, 6, 12, 24, 72 ou 144 horas. Cada grupo consistia de 10 animais ( $n = 5$ / tanque), exceto para os grupos de  $0^{\circ}\text{C}$ , 12 h e  $8^{\circ}\text{C}$ , 6 h de *N. rossii* e de  $0^{\circ}\text{C}$ , 2, 6, 12 h e  $8^{\circ}\text{C}$ , 6 h de *N. coriiceps* em que foram utilizados 9 animais.

A cada dois dias os tanques eram limpos e tinham 50% da água renovada com água do mar previamente aquecida a  $8^{\circ}\text{C}$  (termostato Aquaterm 08 – Full

Gauge®) antes de ser bombeada nos tanques. Os peixes foram alimentados individualmente dia sim, dia não (JAYASUNDARA et al., 2013; CARNEY ALMROTH et al., 2015; RODRIGUES et al., 2015) com aproximadamente 2 g de músculo de peixe antártico ligado a um fio rígido longo (RODRIGUES et al., 2015). Os animais foram observados para determinar se a regurgitação do alimento ocorreu (DONATTI; FANTA, 2002). Os peixes que não se alimentaram foram excluídos dos experimentos. Para todos os grupos, o primeiro dia de aclimação foi o primeiro dia do fornecimento de alimento. Os grupos experimentais (por exemplo, 8°C - 2 h) e os respectivos grupos controle (por exemplo, 0°C - 2 h) foram alimentados e eutanasiados no mesmo período.

Ao fim de cada experimento, foi realizada a coleta de sangue com seringa heparinizada mediante punção da veia caudal. Em seguida, os peixes foram anestesiados com benzocaína 1% (p.v<sup>-1</sup>), eutanasiados através de secção medular e imediatamente dissecados. O plasma foi obtido após centrifugação do sangue total a 2000 g por 10 minutos. As amostras de plasma, brânquia e rim médio-posterior foram congeladas e transportadas em nitrogênio líquido, mantidas em ultrafreezer (-80°C) e analisadas no Laboratório de Biologia Adaptativa – Departamento de Biologia Celular – UFPR.

### 3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

#### 3.3.1 Determinação do parâmetro endócrino

A dosagem do cortisol foi determinada no plasma de *N. rossii* e *N. coriiceps* utilizando o procedimento que segue o princípio do imunoensaio enzimático, utilizando-se kits reagentes comerciais (Cortisol ELISA kit, Cayman Chemical. Item № 500360). A leitura das absorbâncias (412 nm) foi realizada em espectrofotômetro (EPOCH Microplate Spectrophotometer, BioTek, Winooski, VT, USA). Os resultados foram expressos em ng de cortisol/ mL de plasma purificado.

#### 3.3.2 Determinação dos parâmetros metabólicos do plasma

Os metabólitos plasmáticos (glicose, triglicerídeos, colesterol, proteína total e albumina) foram determinados no plasma de *N. rossii* e *N. coriiceps* utilizando kits reagentes comerciais (Labtest Diagnóstica S. A.). A concentração de piruvato, lactato e a atividade da lactato desidrogenase foram mensuradas de acordo com metodologias descritas na literatura. As leituras foram obtidas em espectrofotômetro (EPOCH Microplate Spectrophotometer, BioTek, Winooski, VT, USA). Os resultados de glicose, triglicerídeos e colesterol foram expressos em mM/L; de albumina, globulina e proteína total em g/dL; de piruvato em  $\mu\text{mol/mL}$  de plasma; de lactato em  $\mu\text{mol/mL}$  de plasma; de LDH em mU/mg de proteína.

A glicose plasmática foi avaliada através da metodologia da glicose oxidase-Trinder, onde é formado um complexo de cor vermelha (antipirilquinonimina), cuja absorbância foi medida em 505 nm. O padrão contém glicose 100 mg/dL.

Os triglicerídeos plasmáticos foram determinados através do método enzimático pelo glicerol-3-fosfato oxidase, formando após as reações quinoneimina que foi mensurada a 505 nm. O padrão é formado por triglicerídeos 200 mg/dL e azida sódica 0,045%.

O colesterol total foi determinado enzimaticamente na presença de esterases e da colesterol oxidase gerando ao final do processo a antipirilquinonimina, cuja absorbância foi medida em espectrofotômetro em 500 nm. O reagente padrão é composto por azida sódica 15 mmol/L.

O conteúdo proteico total do plasma foi determinado pelo método do Biureto. O padrão contém albumina bovina a 4,0 g/dL. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 545 nm.

A fração albumínica foi quantificada pelo método do verde de bromocresol. O reagente padrão é composto por albumina bovina a 3,8 g/dL. As absorbâncias foram obtidas espectrofotômetro a 630 nm.

A fração globulina foi calculada subtraindo-se os valores de albumina dos de proteína total do plasma.

A concentração do piruvato plasmático foi determinada pela metodologia de Lu (1939) que consiste na reação da dinitrofenilhidrazina (DNPH). Sendo que a amostra desproteinizada mais o DNPH 0,1% (HCl 2 N) foram mantidos em a

37°C por 30 minutos. Após esse período, foi adicionado NaOH 1,3N. A leitura ocorreu em espectrofotômetro em 440 nm. A concentração de piruvato foi determinada contra um padrão de piruvato de sódio.

O lactato plasmático foi determinado através da formação de um complexo entre o lactato e o sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>). Em tubo de ensaio foi adicionada à amostra desproteinizada, 20 µl de CuSO<sub>4</sub> 4% e 3,5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A solução foi então fervida durante 5 minutos, e após o resfriamento foi adicionado lentamente 80 µl de solução de *p*-fenilfenol e agitado em vórtex. Após 1 hora em descanso foi efetuada nova fervura de 90 segundos, imediatamente resfriados em banho de água e a leitura foi realizada em 570 nm. Para determinação da concentração de lactato na amostra foi utilizado um padrão de lactato (HARROWER; BROWN, 1972).

A atividade da LDH foi determinada com o sistema de reação composto por tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), piruvato de sódio 1 mM, cloreto de potássio 100 mM, β-Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH) 0,254 mM. A reação baseia-se na redução do piruvato em lactato sendo acompanhado o desaparecimento do NADH em 340 nm a 20°C (THUESEN et al., 2005).

### 3.3.3 Determinação dos parâmetros iônicos do plasma

Os íons (magnésio, cálcio, cloreto e fósforo inorgânico,) foram determinados no plasma de *N. rossii* e *N. coriiceps* utilizando kits reagentes comerciais (Labtest Diagnóstica S. A.). As leituras foram obtidas em espectrofotômetro (EPOCH Microplate Spectrophotometer, BioTek, Winooski, VT, USA). Os resultados de cálcio, fósforo inorgânico e magnésio foram expressos em mmol/L.

A determinação quantitativa do magnésio foi medida pelo método colorimétrico Magon sulfonado, formando um complexo de coloração rósea. O reagente padrão contém 2,0 mg/dL de magnésio. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 505 nm.

O íon cálcio foi avaliado pelo método colorimétrico cresolftaleína formando um complexo de cor violeta. O padrão é composto por cálcio 10 mg/dL e formol 0,1%. A leitura foi obtida em espectrofotômetro a 570 nm.

O teor do íon cloreto foi determinado pelo método colorimétrico Tiocianato de coloração amarelada, utilizando-se espectrofotômetro no comprimento de onda de 470 nm. O padrão apresenta concentração de 100 mEq/L (100 mmol/L).

Os íons fosfato foram determinados pelo método colorimétrico Fosfomolibdato. O padrão contém fosfato monobásico de potássio em solução aquosa 5,0 mg/dL. A leitura foi obtida em espectrofotômetro a 340 nm.

#### 3.3.4 Determinação dos parâmetros da defesa antioxidante do plasma

A atividade da SOD foi determinada de acordo com o método de Crouch et al. (1981). O sistema de reação foi constituído por tampão carbonato de sódio 100 mM (pH 10,2), EDTA 17,5  $\mu$ M e 1 mM de NBT (cloreto de azul de nitrotetrazólio). A reação iniciou pela adição de hidroxilamina (37 mM), a qual tem o potencial gerador do superóxido que é capaz de reduzir o NBT presente. A atividade da SOD inibe a redução do NBT. Essa inibição foi acompanhada através do aumento de absorbância em 560 nm a 25°C. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína. Onde 1 unidade de SOD equivale a atividade capaz de inibir a redução do NBT em 50%.

A atividade da CAT foi determinada em meio de reação contendo 50mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,0) e peróxido de hidrogênio a 10 mM. A redução da absorbância foi acompanhada em 240 nm a 25°C (BEUTLER, 1975). Os resultados foram expressos em mU/mg de proteína. Uma unidade de CAT é definida como a quantidade de enzima capaz de consumir 1  $\mu$ mol de substrato ou formar 1  $\mu$ mol de produto por minuto por miligrama de proteína (U/mg de proteína).

### 3.3.5 Determinação da Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase renal e branquial

O tecido renal médio-posterior e branquial<sup>3</sup> foi pesado e homogeneizado em tampão SEID 0,5% (Sacarose 150mM, EDTA dissódico 10mM, Imidazol 50mM, deoxicolato de sódio 0,1%) a uma proporção de 1:4 (m/v), sempre mantidos em banho de gelo. Em seguida, o homogenado foi centrifugado por 7 minutos a 2000 g a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para a determinação da concentração de proteínas (BRADFORD, 1976) e para o ensaio das ATPases renais, descrito por Gibbs e Somero (1989) modificado para microplaca (modificações descritas por KULTZ; SOMERO, 1995).

A atividade da Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase foi mensurada em meio de reação composto por Imidazol 30mM, NaCl 45mM, KCl 15mM, MgCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O 3mM, KCN 0,4mM, 1.0mM de ATP, 0,2mM de NADH, 3IU/ml de PK, 2IU/ml de LDH, 0,1mM de Frutose-1,6-Difosfato e 2mM de PEP. As análises foram realizadas em microplacas de 96 poços, em quadruplicatas. Nas 4 primeiras réplicas foi adicionado somente o meio de reação, sem inibidores. Nas próximas 4 foi adicionado o meio de reação contendo 2mM de ouabaína (inibidor da Na<sup>+</sup> /K<sup>+</sup> - ATPase). A leitura foi realizada em absorbância de 340 nm na temperatura 20°C. Os níveis de atividade da NKA foram expressos como µmol de ATP/h/mg de proteína.

### 3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os parâmetros plasmáticos e a NKA branquial renal analisados neste trabalho foram comparados entre as espécies, entre as temperaturas (0 e 8°C) e, entre as horas de amostragem (2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas) através da análise de variância multivariada fatorial (MANOVA) a um nível de 5% de significância. Os dados foram padronizados e centrados (com média 0 e desvio padrão de 1), a fim de serem comparáveis (SCHIELZETH, 2010). Para obter informações

---

<sup>3</sup> A atividade da Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase branquial foi analisada na tese desenvolvida por Mariana Forgati intitulada "Respostas metabólicas de brânquias de peixes antárticos frente ao estresse térmico", 2016 - UFPR. Entretanto, para a confecção do manuscrito optamos por apresentá-lo conjuntamente.

sobre as respostas plasmáticas entre as espécies, as variáveis foram analisadas em duas escalas: com a matriz total de variáveis resposta e com as variáveis resposta divididas em endócrina, metabólica, iônica, defesa antioxidante e atividade da NKA. Para testar as diferenças entre as espécies, utilizou-se a MANOVA com todos os parâmetros como matriz de resposta e a espécie como variável preditora. Em caso de evidência de efeito significativo dos fatores espécie, temperatura, tempo e/ou interação entre tempo e temperatura, foi aplicado como teste post hoc a análise de variância univariada (ANOVA), individualmente, para cada variável resposta, a um nível de 5% de significância. As interações foram testadas através da análise dos contrastes da variação no tempo entre os diferentes níveis de temperatura para todas as variáveis (FOX; WEISBERG, 2011).

## 4 RESULTADOS

Todos os animais sobreviveram ao longo das 144 horas em ambas as temperaturas (0 e 8°C). A análise de variância multivariada (MANOVA) mostrou que os biomarcadores testados apresentaram diferenças significativas entre as espécies e foram influenciados pelos fatores temperatura e tempo, bem como pela interação entre tempo e temperatura (Tabela 1).

TABELA 1 – RESULTADO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA MULTIVARIADA (MANOVA) PARA OS EFEITOS DA TEMPERATURA E TEMPO NOS GRUPOS DE BIOMARCADORES (ENDÓCRINO, METABÓLICOS, IÔNICOS, DEFESA ANTIOXIDANTE, ATIVIDADE DA  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPASE}$ ) ANALISADOS EM *Notothenia coriiceps* (NC) e *Notothenia rossii* (NR).

Parâmetro	Sp	Temperatura		Tempo		T (°C) X T (h)	
		F	p	F	P	F	P
Endócrino	NC	10.73	0.01 *	2.34	0.14	0.87	0.54
	NR	0.002	0.97	1.78	0.27	0.35	0.86
Metabólicos	NC	31.81	0.002 *	2.55	0.001 *	3.77	0.0008 *
	NR	8.56	0.03 *	1.72	0.04 *	1.45	0.12
Iônicos	NC	4.55	0.03 *	1.88	0.02 *	1.44	0.12
	NR	2.51	0.13	3.62	<0.0001 *	1.56	0.08
Defesa antioxidante	NC	4.66	0.03 *	4.29	0.002 *	3.07	0.012 *
	NR	0.15	0.86	2.70	0.02 *	0.73	0.69
NKA	NC	1.50	0.27	2.27	0.04 *	0.40	0.93
	NR	19.35	0.0003 *	7.86	<0.0001 *	2.86	0.02 *

LEGENDA: Sp = espécie; T (°C) = temperatura; T (h) = tempo em horas. Os asteriscos indicam variação estatística significativa ( $p \leq 0,05$ ).

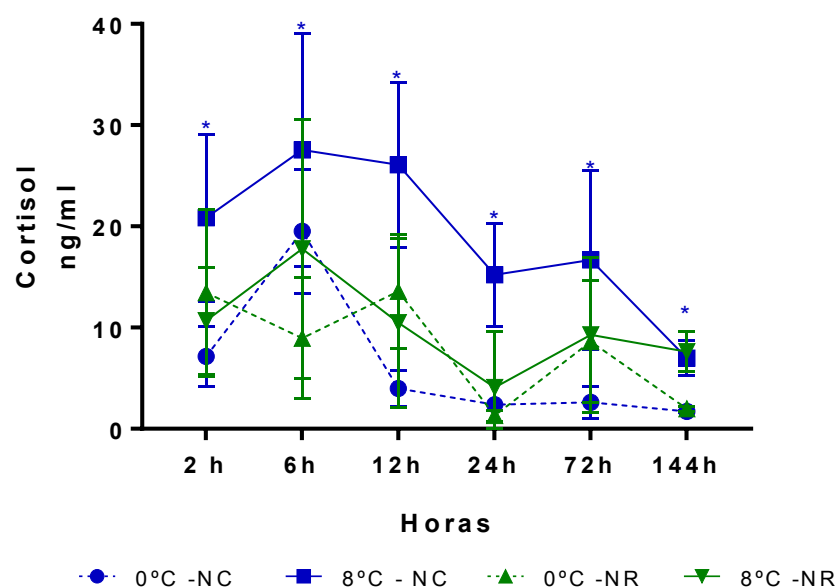
### 4.1 EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO NO PARÂMETRO ENDÓCRINO

A concentração de cortisol plasmático foi afetada pela temperatura em *N. coriiceps* ( $F_{1,8} = 10,73$ ,  $p = 0,01$ ), sendo que níveis mais altos de cortisol foram observados em 8°C (*linear hypotheses test*,  $t = 2,70$ ,  $p = 0,027$ ). Em *N. rossii*, os



níveis de cortisol não foram influenciados pela temperatura nem pelo tempo de exposição. Os níveis de cortisol plasmático entre *N. rossii* e *N. coriiceps* não apresentaram diferenças significativas ( $F_{1,35} = 0,43$ ,  $p = 0,52$ ; Figura 1; Tabela 2).

FIGURA 1 – NÍVEIS DO CORTISOL PLASMÁTICO DE *Notothenia coriiceps* (NC) E *Notothenia rossii* (NR) SUBMETIDOS AO ESTRESSE TÉRMICO



LEGENDA: Níveis de concentração de cortisol plasmático em *Notothenia coriiceps* (linhas azuis) e *Notothenia rossii* (linhas verdes) expostos a 0°C e 8°C durante 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as temperaturas ( $p \leq 0,05$ ). Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média).

TABELA 2 – NÍVEIS DO CORTISOL PLASMÁTICO DE *Notothenia coriiceps* (NC) E *Notothenia rossii* (NR) SUBMETIDOS AO ESTRESSE TÉRMICO (MÉDIA  $\pm$  ERRO PADRÃO DA MÉDIA).

		T (°C)	2h	6h	12h	24h	72h	144h
Cortisol	NC	0°C	7.14 $\pm$ 3.00	19.51 $\pm$ 6.14	3.97 $\pm$ 1.74	2.37 $\pm$ 0.25	2.62 $\pm$ 1.57	1.71 $\pm$ 0.13
		8°C	20.84 $\pm$ 16.28 *	27.56 $\pm$ 11.50 *	26.07 $\pm$ 8.18 *	15.22 $\pm$ 5.06 *	16.67 $\pm$ 8.84 *	6.99 $\pm$ 1.74 *
	NR	0°C	13.46 $\pm$ 8.25	8.95 $\pm$ 5.98	13.57 $\pm$ 5.62	1.30 $\pm$ 0.54	8.61 $\pm$ 6.01	1.97 $\pm$ 0.28
		8°C	10.67 $\pm$ 5.32	17.77 $\pm$ 12.79	10.47 $\pm$ 8.32	4.07 $\pm$ 5.54	9.27 $\pm$ 7.63	5.18 $\pm$ 1.94

LEGENDA: Os níveis de cortisol são expressos em ng.ml<sup>-1</sup>. T (°C) = temperatura. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as temperaturas de 0 e 8°C ( $p \leq 0,05$ ).

## 4.2 EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO NOS PARÂMETROS METABÓLICOS DO PLASMA

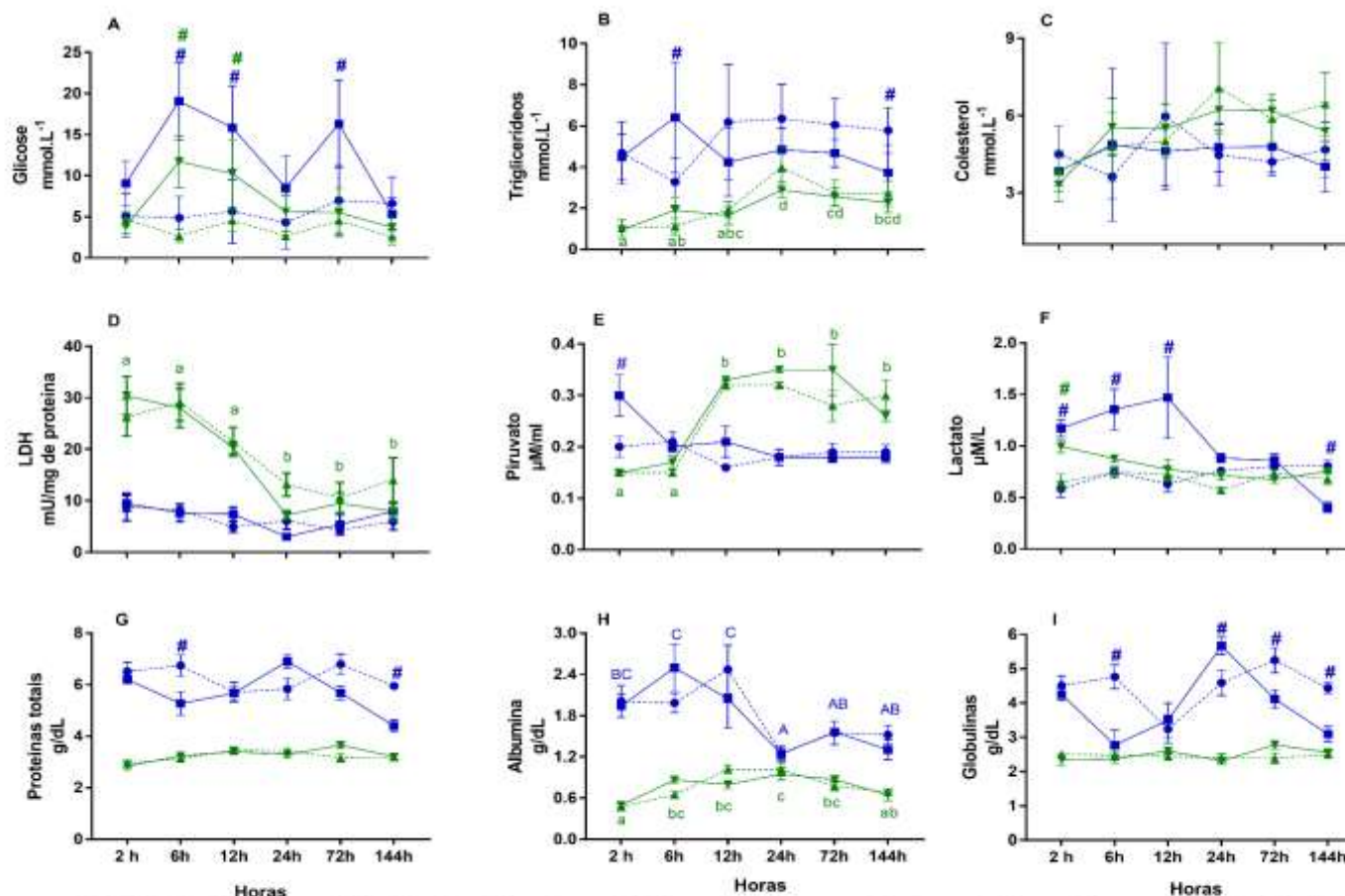
Em *N. coriiceps*, a concentração de glicose ( $F_{5,12} = 3,25$ ,  $p = 0,04$ ), triglicerídeos ( $F_{5,12} = 7,50$ ,  $p = 0,002$ ), piruvato ( $F_{5,12} = 3,81$ ,  $p < 0,03$ ), lactato ( $F_{5,12} = 15,71$ ,  $p = 0$ ), proteínas totais ( $F_{5,12} = 5,25$ ,  $p = 0,009$ ) e globulinas ( $F_{5,12} = 11,67$ ,  $p = 0,0003$ ) plasmáticos foram afetadas pela interação dos fatores tempo e temperatura (Figura 2, Tabela 3). Os animais a 8°C apresentaram resposta hiperglicemiante em 6 ( $F_{1,12} = 20,63$ ,  $p = 0,004$ ), 12 ( $F_{1,12} = 10,69$ ,  $p = 0,03$ ) e 72 h ( $F_{1,12} = 10,79$ ,  $p = 0,03$ ) em relação a 0°C. A concentração de triglicerídeos plasmáticos aumentou em 6 h ( $F_{1,12} = 18,16$ ,  $p = 0,007$ ) e reduziu em 144 h ( $F_{1,12} = 8,92$ ,  $p = 0,05$ ) a 8°C. A concentração de piruvato plasmático encontrava-se elevada em 2 h a 8°C ( $F_{1,12} = 17,87$ ,  $p = 0,007$ ), não havendo diferenças nos demais tempos analisados. Os níveis de lactato plasmático, em *N. coriiceps*, foram maiores em 2 ( $F_{1,12} = 27,65$ ,  $p = 0,0009$ ), 6 ( $F_{1,12} = 27,71$ ,  $p = 0,0009$ ) e 12 h ( $F_{1,12} = 56,23$ ,  $p < 0,0001$ ) e reduziram em 144 h ( $F_{1,12} = 10,51$ ,  $p = 0,02$ ) a 8°C. A concentração de proteínas totais reduziu em 6 ( $F_{1,12} = 11,11$ ,  $p = 0,03$ ) e 144 h ( $F_{1,12} = 13,31$ ,  $p = 0,02$ ) em *N. coriiceps* mantidos a 8°C em relação a 0°C. A concentração de globulinas flutuou ao longo do tempo, apresentando valores menores em 6 ( $F_{1,12} = 36,13$ ,  $p = 0,0004$ ), 72 ( $F_{1,12} = 10,84$ ,  $p = 0,026$ ) e 144 h ( $F_{1,12} = 16,49$ ,  $p = 0,008$ ), com um pico em 24 h ( $F_{1,12} = 10,43$ ,  $p = 0,03$ ) a 8°C.

Os níveis de albumina plasmática de *N. coriiceps* variaram ao longo do tempo ( $F_{5,12} = 12,54$ ,  $p < 0,0002$ ; Tabela 3). Em 24 h observou-se redução significativa em relação a 2h ( $t = 3,77$ ,  $p = 0,015$ ), 6h ( $t = 5,23$ ,  $p < 0,001$ ) e 12 h ( $t = 5,26$ ,  $p < 0,001$ ). Os parâmetros colesterol e LDH não apresentaram influência dos fatores temperatura e tempo (Figura 2, Tabela 3).

Em *N. rossii*, a concentração de glicose ( $F_{5,12} = 9,78$ ,  $p = 0,0006$ ) e lactato plasmáticas ( $F_{5,12} = 10,42$ ,  $p = 0,007$ ) foi influenciada pela interação dos fatores tempo e temperatura. Os níveis de glicose foram maiores em 8°C em 6 ( $t = 59,69$ ,  $p < 0,0001$ ) e 12 h ( $t = 24,18$ ,  $p = 0,002$ ). Os níveis de lactato foram maiores em 2h ( $t = 16,29$ ,  $p = 0,008$ ) em 8°C (Figura 2, Tabela 3).

Em *N. rossii*, os níveis de proteínas totais e globulinas não foram influenciados pelos fatores temperatura e tempo, enquanto que a concentração de albumina ( $F_{5,12} = 13,85$ ,  $p = 0,0001$ ), triglicerídeos ( $F_{5,12} = 24,76$ ,  $p < 0,0001$ ), colesterol ( $F_{5,12} = 8,86$ ,  $p = 0,001$ ), piruvato ( $F_{5,12} = 14,81$ ,  $p < 0,0001$ ) e LDH ( $F_{5,12} = 17,78$ ,  $p < 0,0001$ ) plasmáticos foram influenciados pelo tempo de exposição (Tabela 3). Em *N. rossii*, a concentração de albumina foi maior em 6 ( $t = 3,39$ ,  $p = 0,03$ ), 12 ( $t = 5,38$ ,  $p < 0,001$ ), 24 ( $t = 6,42$ ,  $p < 0,001$ ) e 72 h ( $t = 4,28$ ,  $p = 0,005$ ) em relação a 2 h e foi maior em 24 horas em relação a 144 h ( $t = 4,14$ ,  $p = 0,007$ ). A concentração de triglicerídeos aumentou em 24 h em relação a 2 ( $t = 7,60$ ,  $p < 0,001$ ), 6 ( $t = 5,95$ ,  $p < 0,001$ ) e 12 h ( $t = 5,13$ ,  $p < 0,001$ ). Em 72 h, os triglicerídeos plasmáticos permaneceram elevados em relação à 2 ( $t = 5,16$ ,  $p < 0,001$ ) e 6 h ( $t = 3,52$ ,  $p < 0,03$ ); e em 144 horas, maiores níveis foram observados em relação à 2 h ( $t = 4,73$ ,  $p = 0,002$ ). Os níveis de colesterol plasmático foram maiores em 12 ( $t = 3,30$ ,  $p = 0,04$ ), 24 ( $t = 6,04$ ,  $p < 0,001$ ), 72 ( $t = 4,89$ ,  $p = 0,001$ ) e 144 h ( $t = 4,68$ ,  $p = 0,002$ ) em relação a 2 h. A partir de 12 h, os níveis de piruvato plasmático, foram maiores em relação a 2 e 6 h. A atividade da LDH plasmática foi menor em 24, 72 e 144 h em relação aos tempos iniciais.

*N. rossii* e *N. coriiceps* apresentaram diferenças significativas nos níveis de albumina ( $F_{1,35} = 77,54$ ,  $p < 0,0001$ ), glicose ( $F_{1,35} = 7,10$ ,  $p = 0,01$ ), globulina ( $F_{1,35} = 63,88$ ,  $p < 0,0001$ ), proteínas totais ( $F_{1,35} = 174,19$ ,  $p < 0,0001$ ), triglicerídeos ( $F_{1,35} = 98,52$ ,  $p < 0,0001$ ), piruvato ( $F_{1,35} = 5,50$ ,  $p < 0,02$ ), colesterol ( $F_{1,35} = 4,14$ ,  $p = 0,04$ ) e LDH ( $F_{1,35} = 32,41$ ,  $p < 0,0001$ ) plasmáticos. Somente o lactato plasmático não apresentou diferença significativa ( $F_{1,35} = 1,95$ ,  $p = 0,17$ ) entre as espécies (Tabela 2).

FIGURA 2 – NÍVEIS DOS PARÂMETROS METABÓLICOS PLASMÁTICOS DE *Notothernia coriiceps* (NC) E *Notothernia rossi* (NR) SUBMETIDOS AO ESTRESSE TÉRMICO

LEGENDA: Níveis de glicose (A), triglicerídeos (B), colesterol (C), lactato desidrogenase (D), piruvato (E), lactato (F), proteínas totais (G), albumina (H) e globulinas (I) no plasma de *Notothernia coriiceps* (linhas azuis) e *Notothernia rossi* (linhas verdes) expostos a 0°C e 8°C durante 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas. As letras diferentes indicam diferenças ao longo do tempo de exposição em 0°C e 8°C. O jogo da velha indica interação entre os fatores tempo e temperatura (p < 0,05). Os dados estão expressos como média ± EPM (erro padrão da média).

TABELA 3 – NÍVEIS DOS PARÂMETROS METABÓLICOS PLASMÁTICOS DE *Notothenia coriiceps* (NC) E *Notothenia rossi* (NR) SUBMETIDOS AO ESTRESSE TÉRMICO (MÉDIA ± ERRO PADRÃO DA MÉDIA).

		T (°C)	2h	6h	12h	24h	72h	144h
<b>Glu</b>	NC	0	5.11 ± 2.67	4.88 ± 2.60	5.68 ± 3.87	4.33 ± 3.22	7.01 ± 4.29	6.64 ± 3.21
		8	9.07 ± 3.73	19.07 ± 8.69 #	15.85 ± 10.07 #	8.55 ± 3.87	16.31 ± 10.33 #	5.35 ± 1.97
	NR	0	4.71 ± 0.86	2.67 ± 0.77	4.55 ± 1.31	2.67 ± 0.42	4.55 ± 1.51	2.55 ± 0.91
		8	3.86 ± 0.93	11.73 ± 3.13 #	10.27 ± 4.10 #	5.63 ± 2.34	5.50 ± 2.95	3.74 ± 1.13
<b>TG</b>	NC	0	4.69 ± 1.49	3.28 ± 1.15	6.19 ± 2.78	6.35 ± 1.67	6.05 ± 1.31	5.78 ± 1.10
		8	4.49 ± 1.10	6.41 ± 2.68 #	4.24 ± 1.67	4.84 ± 1.06	4.68 ± 0.68	3.73 ± 1.34 #
	NR	0	1.03 ± 0.40 <sup>a</sup>	1.11 ± 0.39 <sup>ab</sup>	1.92 ± 0.42 <sup>abc</sup>	3.99 ± 0.94 <sup>d</sup>	2.74 ± 0.64 <sup>cd</sup>	2.71 ± 0.62 <sup>bcd</sup>
		8	0.96 ± 0.18 <sup>a</sup>	1.90 ± 0.64 <sup>ab</sup>	1.65 ± 0.44 <sup>abc</sup>	2.89 ± 0.36 <sup>d</sup>	2.55 ± 0.42 <sup>cd</sup>	2.28 ± 0.49 <sup>bcd</sup>
<b>Col</b>	NC	0	4.51 ± 1.08	3.63 ± 0.85	5.97 ± 2.84	4.47 ± 1.19	4.20 ± 0.52	4.68 ± 1.06
		8	3.84 ± 0.55	4.87 ± 2.97	4.61 ± 1.34	4.77 ± 0.94	4.80 ± 0.99	4.02 ± 0.99
	NR	0	3.85 ± 0.78 <sup>a</sup>	4.78 ± 1.32 <sup>ab</sup>	5.01 ± 0.66 <sup>b</sup>	7.07 ± 1.76 <sup>b</sup>	5.88 ± 0.96 <sup>b</sup>	6.44 ± 1.22 <sup>b</sup>
		8	3.33 ± 0.66 <sup>a</sup>	5.54 ± 1.14 <sup>ab</sup>	5.49 ± 0.96 <sup>b</sup>	6.22 ± 0.81 <sup>b</sup>	6.19 ± 0.40 <sup>b</sup>	5.39 ± 1.10 <sup>b</sup>
<b>LDH</b>	NC	0	40.55 ± 22.45	52.44 ± 18.47	24.38 ± 11.33	31.04 ± 21.89	29.67 ± 14.27	34.17 ± 25.90
		8	57.57 ± 27.21	38.49 ± 21.02	43.24 ± 16.75	20.86 ± 10.05	21.93 ± 9.66	35.91 ± 20.32
	NR	0	77.83 ± 35.68 <sup>a</sup>	89.53 ± 28.47 <sup>a</sup>	74.68 ± 31.56 <sup>b</sup>	45.09 ± 23.52 <sup>b</sup>	39.86 ± 28.57 <sup>b</sup>	33.25 ± 26.28 <sup>b</sup>
		8	85.66 ± 27.88 <sup>a</sup>	89.92 ± 34.11 <sup>a</sup>	69.03 ± 11.48 <sup>b</sup>	23.78 ± 7.93 <sup>b</sup>	34.54 ± 22.37 <sup>b</sup>	25.66 ± 18.36 <sup>b</sup>
<b>Piruv</b>	NC	0	0.23 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.16 ± 0.007	0.18 ± 0.015	0.19 ± 0.017	0.19 ± 0.014
		8	0.30 ± 0.04 #	0.20 ± 0.007	0.21 ± 0.03	0.18 ± 0.016	0.18 ± 0.010	0.18 ± 0.011
	NR	0	0.15 ± 0.004 <sup>a</sup>	0.15 ± 0.006 <sup>a</sup>	0.32 ± 0.008 <sup>b</sup>	0.32 ± 0.005 <sup>b</sup>	0.28 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.30 ± 0.03 <sup>b</sup>
		8	0.15 ± 0.003 <sup>a</sup>	0.17 ± 0.012 <sup>a</sup>	0.33 ± 0.007 <sup>b</sup>	0.35 ± 0.005 <sup>b</sup>	0.35 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.26 ± 0.01 <sup>b</sup>
<b>Lact</b>	NC	0	0.58 ± 0.21	0.74 ± 0.16	0.63 ± 0.23	0.76 ± 0.09	0.80 ± 0.12	0.80 ± 0.15
		8	1.17 ± 0.27 #	1.36 ± 0.52 #	1.18 ± 0.78 #	0.88 ± 0.13	0.86 ± 0.19	0.40 ± 0.13 #
	NR	0	0.71 ± 0.12	0.75 ± 0.09	0.72 ± 0.17	0.57 ± 0.08	0.73 ± 0.10	0.68 ± 0.13
		8	0.99 ± 0.15 #	0.88 ± 0.10	0.77 ± 0.24	0.71 ± 0.11	0.67 ± 0.11	0.75 ± 0.05
<b>PT</b>	NC	0	6.52 ± 0.97	6.74 ± 1.22	5.71 ± 1.15	5.84 ± 1.30	6.79 ± 1.27	5.95 ± 0.47
		8	6.20 ± 0.49	5.26 ± 1.20 #	5.67 ± 0.79	6.90 ± 0.77	5.68 ± 0.82	4.40 ± 0.61 #
	NR	0	2.94 ± 0.37	3.13 ± 0.39	3.46 ± 0.35	3.42 ± 0.23	3.17 ± 0.51	3.18 ± 0.34
		8	2.84 ± 0.41	3.13 ± 0.39	3.40 ± 0.27	3.29 ± 0.35	3.65 ± 0.37	3.20 ± 0.31
<b>Alb</b>	NC	0	2.01 ± 0.66 <sup>bc</sup>	1.98 ± 0.42 <sup>c</sup>	2.47 ± 1.06 <sup>c</sup>	1.25 ± 0.38 <sup>a</sup>	1.55 ± 0.54 <sup>ab</sup>	1.52 ± 0.41 <sup>ab</sup>
		8	1.94 ± 0.52 <sup>bc</sup>	2.49 ± 0.91 <sup>c</sup>	2.05 ± 1.19 <sup>c</sup>	1.24 ± 0.27 <sup>a</sup>	1.56 ± 0.17 <sup>ab</sup>	1.30 ± 0.39 <sup>ab</sup>
	NR	0	0.47 ± 0.17 <sup>a</sup>	0.65 ± 0.14 <sup>bc</sup>	1.02 ± 0.18 <sup>bc</sup>	1.02 ± 0.28 <sup>c</sup>	0.77 ± 0.20 <sup>bc</sup>	0.69 ± 0.15 <sup>ab</sup>
		8	0.50 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.86 ± 0.13 <sup>bc</sup>	0.80 ± 0.16 <sup>bc</sup>	0.95 ± 0.27 <sup>c</sup>	0.87 ± 0.14 <sup>bc</sup>	0.64 ± 0.26 <sup>ab</sup>
<b>Glob</b>	NC	0	4.51 ± 0.80	4.76 ± 1.05	3.24 ± 1.23	4.59 ± 1.15	5.25 ± 1.16	4.43 ± 0.46
		8	4.25 ± 0.58	2.77 ± 1.16 #	3.50 ± 1.30	5.66 ± 0.80 #	4.12 ± 0.79 #	3.09 ± 0.59 #
	NR	0	2.51 ± 0.28	2.48 ± 0.34	2.44 ± 0.32	2.40 ± 0.32	2.39 ± 0.43	2.50 ± 0.31
		8	2.34 ± 0.38	2.37 ± 0.36	2.60 ± 0.23	2.31 ± 0.27	2.78 ± 0.38	2.56 ± 0.22

LEGENDA: Os níveis de glicose (Gli), triglicerídeos (TG), colesterol (Col) são expressos em mmol.L<sup>-1</sup>; lactato desidrogenase (LDH) em mU/mg de proteína; piruvato (Piruv) e lactato (Lact) em µmol.L<sup>-1</sup>; proteínas totais (PT), albumina (Alb) e globulinas (Glob) são expressos em g.L<sup>-1</sup>. T (°C) = temperatura. As letras diferentes indicam diferenças ao longo do tempo de exposição em 0°C e 8°C. O jogo da velha indica interação entre os fatores tempo e temperatura (p ≤ 0,05).

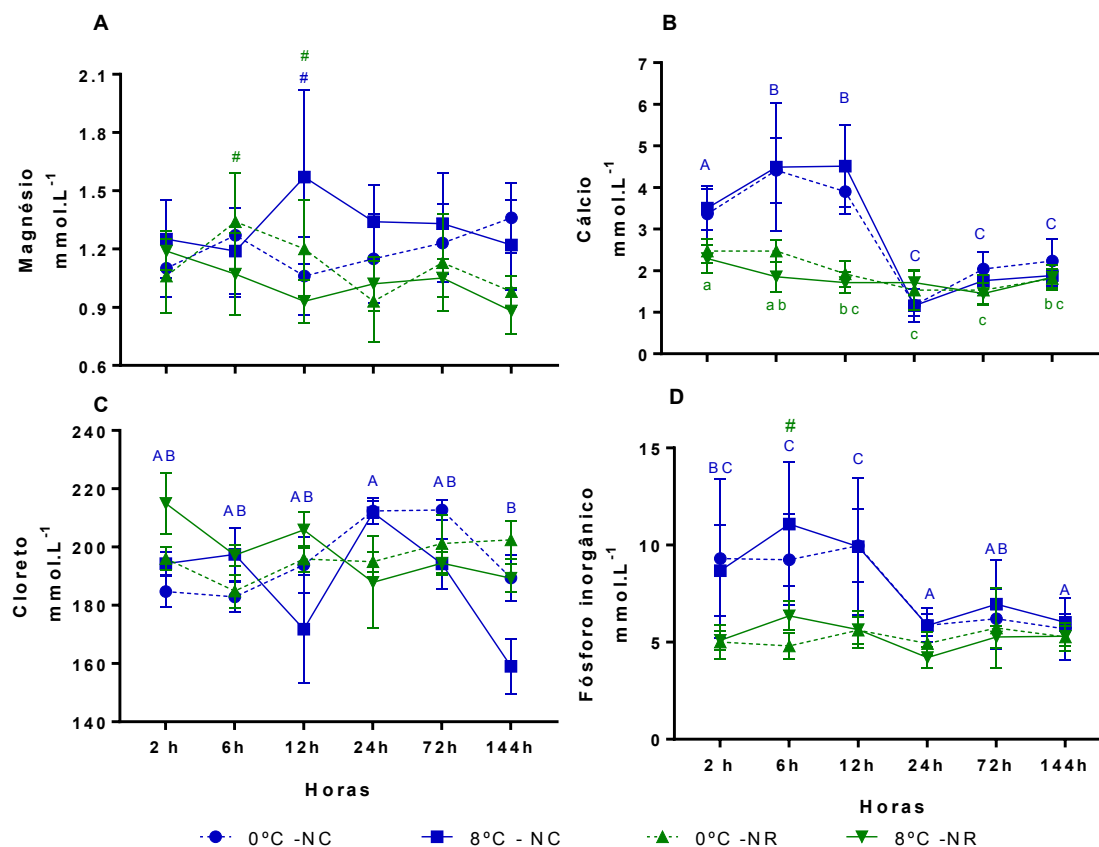
### 4.3 EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO NOS PARÂMETROS IÔNICOS DO PLASMA

O cálcio ( $F_{5,12} = 34,66$ ,  $p < 0,0001$ ), cloreto ( $F_{5,12} = 11,81$ ,  $p = 0,009$ ) e fósforo ( $F_{5,12} = 10,81$ ,  $p = 0,0004$ ) apresentaram variação ao longo do tempo em *N. coriiceps*. O cálcio apresentou maiores níveis de concentração em 6 e 12 h, havendo redução a partir de 24 h em relação aos tempos iniciais. *N. coriiceps* mantidos por 144 h apresentaram menor concentração de cloreto em relação aos mantidos por 24 h ( $t = 3,82$ ,  $p = 0,01$ ) e a concentração de fósforo inorgânico reduziu a partir de 24 h em relação aos tempos anteriores. A concentração de magnésio ( $F_{5,12} = 6,56$ ,  $p = 0,004$ ) foi influenciada pela interação entre tempo e temperatura, sendo que em 12 h ( $t = 23,23$ ,  $p = 0,003$ ) constatou-se a hipermagnesemia em 8°C (Figura 3, Tabela 4).

Em *N. rossii*, a concentração de magnésio ( $F_{5,12} = 6,56$ ,  $p = 0,004$ ) e fósforo ( $F_{1,12} = 4,21$ ,  $p = 0,02$ ) plasmáticos foram afetadas pela interação entre tempo e temperatura. O magnésio apresentou menores níveis de concentração em 6 ( $F_{1,12} = 17,72$ ,  $p = 0,007$ ) e 12h ( $F_{1,12} = 14,58$ ,  $p = 0,01$ ) nos indivíduos mantidos a 8°C. A concentração de fósforo inorgânico plasmático foi maior em 6 h em *N. rossii* mantidos a 8°C relação a 0°C. Em *N. rossii*, o fator tempo ( $F_{5,12} = 3,62$ ,  $p < 0,0001$ ) influenciou a concentração de cálcio ( $F_{5,12} = 12,18$ ,  $p = 0,0002$ ) plasmático. Os níveis de cálcio foram menores em 12 ( $t = 3,61$ ,  $p = 0,02$ ), 24 ( $t = 4,90$ ,  $p = 0,001$ ), 72 ( $t = 5,61$ ,  $p < 0,001$ ) e 144 h ( $t = 3,54$ ,  $p = 0,02$ ) em relação a 2 h; e, em 24 ( $t = 3,41$ ,  $p = 0,03$ ) e 72 h ( $t = 4,14$ ,  $p = 0,007$ ) foram menores que os observados em 6 h. Os valores de cloreto plasmáticos não foram influenciados pela temperatura e tempo (Figura 3, Tabela 4).

*N. rossii* e *N. coriiceps* apresentaram diferenças significativas nas concentrações plasmáticas de cálcio ( $F_{1,35} = 7,46$ ,  $p < 0,01$ ), fósforo ( $F_{1,35} = 20,98$ ,  $p < 0,0001$ ) e magnésio ( $F_{1,35} = 10,75$ ,  $p = 0,002$ ) enquanto que os íons cloreto ( $F_{1,35} = 1,15$ ,  $p = 0,29$ ) não apresentaram.

FIGURA 3 – NÍVEIS DOS PARÂMETROS IÔNICOS PLASMÁTICOS DE *Notothenia coriiceps* (NC) E *Notothenia rossii* (NR) SUBMETIDOS AO ESTRESSE TÉRMICO



LEGENDA: Níveis de concentração de magnésio (A), cálcio (B), cloreto (C) e magnésio (D) plasmáticos em *Notothenia coriiceps* (linhas azuis) e *Notothenia rossii* (linhas verdes) expostos a 0°C e 8°C durante 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas. As letras diferentes indicam diferenças ao longo do tempo de exposição em 0°C e 8°C. O jogo da velha indica interação entre os fatores tempo e temperatura ( $p \leq 0,05$ ). Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média).

TABELA 4 - NÍVEIS DOS PARÂMETROS IÔNICOS DO PLASMA DE *Notothenia coriiceps* (NC) E *Notothenia rossi* (NR) SUBMETIDOS AO ESTRESSE TÉRMICO (MÉDIA ± ERRO PADRÃO DA MÉDIA).

		T (°C)	2h	6h	12h	24h	72h	144h
<b>Mg<sup>+2</sup></b>	NC	0	1.10 ± 0.15	1.27 ± 0.32	1.06 ± 0.20	1.15 ± 0.23	1.23 ± 0.20	1.36 ± 0.18
		8	1.25 ± 0.20	1.19 ± 0.22	1.57 ± 0.43 #	1.34 ± 0.19	1.33 ± 0.26	1.22 ± 0.23
	NR	0	1.06 ± 0.19	1.34 ± 0.25	1.20 ± 0.25	0.93 ± 0.21	1.13 ± 0.25	0.98 ± 0.08
		8	1.19 ± 0.10	1.07 ± 0.21 #	0.93 ± 0.11 #	1.02 ± 0.14	1.05 ± 0.10	0.88 ± 0.12
<b>Ca<sup>+2</sup></b>	NC	0	3.36 ± 0.59 <sup>a</sup>	4.41 ± 0.79 <sup>b</sup>	3.90 ± 0.55 <sup>b</sup>	1.17 ± 0.25 <sup>c</sup>	2.04 ± 0.41 <sup>c</sup>	2.23 ± 0.53 <sup>c</sup>
		8	3.50 ± 0.53 <sup>a</sup>	4.49 ± 1.55 <sup>b</sup>	4.51 ± 0.98 <sup>b</sup>	1.16 ± 0.40 <sup>c</sup>	1.76 ± 0.29 <sup>c</sup>	1.88 ± 0.25 <sup>c</sup>
	NR	0	2.47 ± 0.30 <sup>a</sup>	2.47 ± 0.27 <sup>ab</sup>	1.92 ± 0.32 <sup>bc</sup>	1.53 ± 0.47 <sup>c</sup>	1.53 ± 0.36 <sup>c</sup>	1.81 ± 0.23 <sup>bc</sup>
		8	2.29 ± 0.34 <sup>a</sup>	1.85 ± 0.36 <sup>ab</sup>	1.71 ± 0.25 <sup>bc</sup>	1.71 ± 0.30 <sup>c</sup>	1.45 ± 0.25 <sup>c</sup>	1.84 ± 0.30 <sup>bc</sup>
<b>Cl<sup>-</sup></b>	NC	0	184.72 ± 15.05 <sup>ab</sup>	182.87 ± 15.76 <sup>ab</sup>	193.84 ± 28.40 <sup>ab</sup>	212.38 ± 13.68 <sup>a</sup>	212.68 ± 10.94 <sup>ab</sup>	189.37 ± 24.06 <sup>b</sup>
		8	194.28 ± 12.06 <sup>ab</sup>	197.46 ± 24.24 <sup>ab</sup>	171.82 ± 52.66 <sup>ab</sup>	211.79 ± 12.69 <sup>a</sup>	194.18 ± 25.66 <sup>ab</sup>	159.04 ± 25.00 <sup>b</sup>
	NR	0	196.12 ± 12.10	184.89 ± 15.95	195.90 ± 12.80	194.93 ± 9.49	201.18 ± 28.21	202.44 ± 20.67
		8	214.98 ± 25.96	197.19 ± 9.99	205.87 ± 14.82	187.92 ± 44.50	194.45 ± 12.59	189.26 ± 15.05
<b>Pi</b>	NC	0	9.31 ± 4.08 <sup>bc</sup>	9.24 ± 2.34 <sup>c</sup>	9.97 ± 1.88 <sup>c</sup>	5.87 ± 0.87 <sup>a</sup>	6.20 ± 1.54 <sup>ab</sup>	5.68 ± 1.57 <sup>a</sup>
		8	8.68 ± 2.34 <sup>bc</sup>	11.08 ± 3.18 <sup>c</sup>	9.92 ± 3.51 <sup>c</sup>	5.86 ± 0.57 <sup>a</sup>	6.96 ± 2.29 <sup>ab</sup>	6.02 ± 0.42 <sup>a</sup>
	NR	0	5.01 ± 0.88	4.81 ± 0.66	5.62 ± 0.69	4.93 ± 0.60	5.73 ± 2.06	5.27 ± 0.73
		8	5.09 ± 0.51	6.36 ± 0.76 <sup>#</sup>	5.64 ± 0.95	4.20 ± 0.54	5.27 ± 0.57	5.31 ± 0.51

Legenda: Os níveis de magnésio (Mg<sup>+2</sup>), cálcio (Ca<sup>+2</sup>), cloreto (Cl<sup>-</sup>) e fósforo inorgânico (PO<sub>4</sub>) são expressos em mmol.L<sup>-1</sup>. T (°C) = temperatura. As letras diferentes indicam diferenças ao longo do tempo de exposição em 0°C e 8°C. O jogo da velha indica interação entre os fatores tempo e temperatura (p ≤ 0,05).

#### 4.4 EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO NOS PARÂMETROS DA DEFESA ANTIOXIDANTE DO PLASMA

A SOD plasmática de *N. coriiceps* foi influenciada pela interação entre os fatores tempo e temperatura ( $F_{5,12} = 3,29$ ,  $p = 0,04$ ). Sendo que em 6 h houve um pico da atividade da SOD em 8°C em relação à 0°C e demais tempos analisados ( $F_{1,12} = 13,54$ ,  $p = 0,02$ ; Figura 4A). A CAT foi afetada pela temperatura ( $F_{1,12} = 9,32$ ,  $p = 0,01$ ), com maior atividade em 8°C em relação a 0°C ( $t = 2,36$ ,  $p = 0,03$ ), especialmente nos tempos de 2, 6 e 12 h (Figura 4B, Tabela 5).

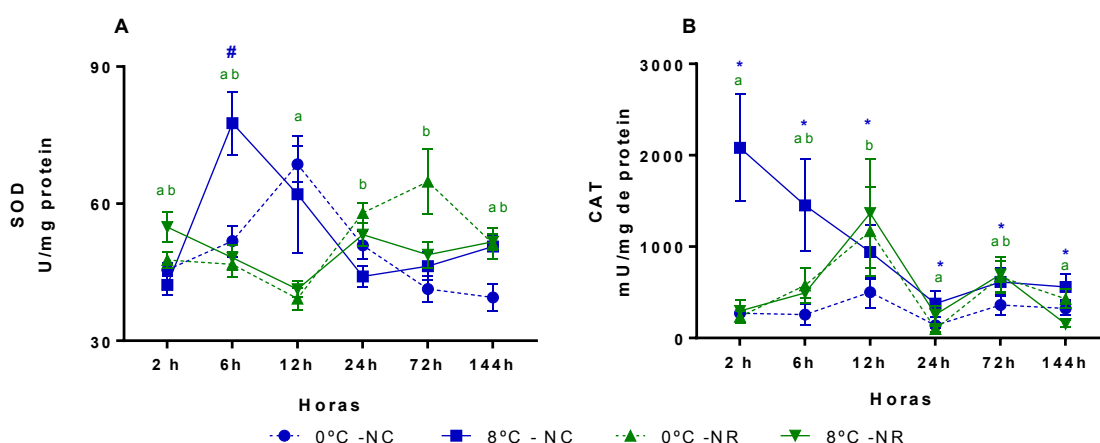
A SOD e CAT plasmáticas de *N. rossi* foram influenciadas pelo fator tempo ( $F_{5,12} = 2,70$ ,  $p = 0,02$ ). A SOD apresentou maior atividade em 24 ( $t = 3,90$ ,  $p = 0,01$ ) e 72 h ( $t = 3,69$ ,  $p = 0,02$ ; Figura 4A) em relação a 12 h. A CAT



apresentou um pico de atividade em 12 h em relação a 2 ( $t = 4,08$ ,  $p = 0,007$ ), 24 ( $t = 4,37$ ,  $p = 0,004$ ) e 144 h ( $t = 3,92$ ,  $p = 0,01$ ) (Figura 4B, Tabela 5).

Ao compararmos os níveis de atividade da SOD ( $F_{1,35} = 0,01$ ,  $p = 0,92$ ) e CAT ( $F_{1,35} = 0,34$ ,  $p = 0,56$ ) plasmáticas entre *N. rossii* e *N. coriiceps*, não se observaram diferenças significativas.

FIGURA 4 – NÍVEIS DOS PARÂMETROS DA DEFESA ANTIOXIDANTE PLASMÁTICOS DE *Notothenia coriiceps* (NC) E *Notothenia rossii* (NR) SUBMETIDOS AO ESTRESSE TÉRMICO



LEGENDA: Níveis de atividade da SOD (A) e CAT (B) do plasma de *Notothenia coriiceps* (linhas azuis) e *Notothenia rossii* (linhas verdes) expostos a 0°C e 8°C durante 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas. Os níveis de atividade da superóxido dismutase (A) são expressos em U/mg de proteína e da catalase (B) em mU/mg de proteína. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre as temperaturas de 0 e 8°C. As letras diferentes indicam diferenças ao longo do tempo de exposição em 0°C e 8°C. O jogo da velha indica interação entre os fatores tempo e temperatura ( $p \leq 0,05$ ). Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média).

TABELA 5 - NÍVEIS DOS PARÂMETROS DA DEFESA ANTIOXIDANTE DO PLASMA DE *Notothenia coriiceps* (NC) E *Notothenia rossii* (NR) SUBMETIDOS AO ESTRESSE TÉRMICO (MÉDIA  $\pm$  ERRO PADRÃO DA MÉDIA).

PERMISO (MEDIA ± ERROR) PARA O DIA (MEDIA).								
		T (°C)	2h	6h	12h	24h	72h	144h
SOD	NC	0	45.54 ± 4.15	51.83 ± 10.17	68.65 ± 11.80	50.88 ± 9.72	41.34 ± 8.70	39.48 ± 9.06
		8	42.25 ± 7.00	77.60 ± 18.26 #	62.05 ± 33.96	44.10 ± 7.02	46.32 ± 9.25	50.61 ± 6.97
	NR	0	47.68 ± 5.62 <sup>ab</sup>	46.72 ± 8.17 <sup>ab</sup>	39.22 ± 7.30 <sup>a</sup>	57.95 ± 6.67 <sup>b</sup>	64.83 ± 14.32 <sup>b</sup>	51.24 ± 10.64 <sup>ab</sup>
		8	54.88 ± 8.13 <sup>ab</sup>	48.18 ± 8.29 <sup>ab</sup>	41.26 ± 4.15 <sup>a</sup>	53.22 ± 7.26 <sup>b</sup>	48.82 ± 9.07 <sup>b</sup>	51.67 ± 5.48 <sup>ab</sup>
CAT	NC	0	275.17 ± 35.24	256.42 ± 113.12	501.27 ± 273.90	177.35 ± 142.76	361.17 ± 343.46	670.30 ± 295.00
		8	2081.77 ± 443.10 <sup>*</sup>	1451.90 ± 227.76 <sup>*</sup>	941.75 ± 479.87 <sup>*</sup>	273.46 ± 117.08 <sup>*</sup>	612.96 ± 326.43 <sup>*</sup>	372.13 ± 211.20 <sup>*</sup>
	NR	0	234.71 ± 210.69 <sup>a</sup>	576.35 ± 517.29 <sup>ab</sup>	1168.77 ± 1081.00 <sup>b</sup>	99.17 ± 100.84 <sup>a</sup>	667.89 ± 526.40 <sup>ab</sup>	418.09 ± 212.26 <sup>a</sup>
		8	295.97 ± 300.29 <sup>a</sup>	492.98 ± 158.83 <sup>ab</sup>	1365.77 ± 1458.77 <sup>b</sup>	255.28 ± 234.99 <sup>a</sup>	696.77 ± 563.64 <sup>ab</sup>	154.85 ± 104.71 <sup>a</sup>

LEGENDA: Os níveis de atividade da superóxido dismutase (SOD) são expressos em U/mg de proteína e da catalase (CAT) em mU/mg de proteína. T (°C) = temperatura. Os asteriscos indicam diferença significativa entre os animais mantidos em 0 e 8°C. As letras diferentes indicam

diferenças ao longo do tempo de exposição em 0°C e 8°C. O jogo da velha indica interação entre os fatores tempo e temperatura ( $p \leq 0,05$ ).

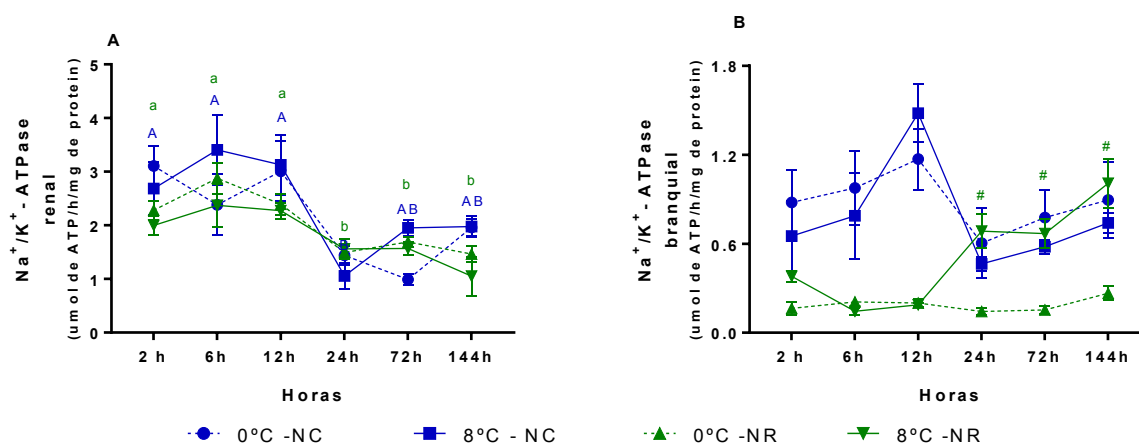
#### 4.5 EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO NA $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPASE}$ RENAL E BRANQUIAL

Em *N. coriiceps*, a NKA renal foi afetada pelo efeito do tempo ( $F_{5,12} = 3,91$ ,  $p = 0,02$ ). Em 24 h houve redução da atividade da NKA renal em relação a 2 h ( $t = 3,50$ ,  $p = 0,03$ ), 6 h ( $t = 3,62$ ,  $p = 0,02$ ) e 12 h ( $t = 3,75$ ,  $p = 0,02$ ) (Figura 5A). Enquanto a NKA branquial não apresentou influência de nenhuma das variáveis analisadas (Figura 5B, Tabela 6).

Em *N. rossii*, a NKA renal foi afetada pelo efeito do tempo ( $F_{5,12} = 26,44$ ,  $p < 0,0001$ ). A partir de 24 h houve redução da atividade da NKA renal em relação aos tempos iniciais (Figura 5A). A NKA branquial apresentou interação entre os fatores tempo e temperatura ( $F_{5,12} = 7,33$ ,  $p < 0,002$ ) com maiores atividades na temperatura de 8°C em 24 ( $F_{1,12} = 20,19$ ,  $p = 0,004$ ), 72 ( $F_{1,12} = 17,65$ ,  $p = 0,005$ ) e 144 h ( $F_{1,12} = 37,81$ ,  $p = 0,0002$ ) em relação aos controles (0°C) (Figura 5B, Tabela 6).

*N. rossii* e *N. coriiceps* não apresentaram diferenças significativas na atividade da NKA renal ( $F_{1,35} = 1,92$ ,  $p = 0,17$ ), enquanto a atividade da NKA branquial entre as espécies se mostrou significativa ( $F_{1,35} = 24,41$ ,  $p < 0,0001$ ).

FIGURA 5 – NÍVEIS DA PARÂMETROS DA ATIVIDADE DA  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPASE}$  RENAL E BRANQUIAL DE *Notothenia coriiceps* (NC) E *Notothenia rossii* (NR) SUBMETIDOS AO ESTRESSE TÉRMICO



LEGENDA: Níveis de atividade da NKA renal (A) e branquial (B) de *Notothenia coriiceps* (linhas azuis) e

*Notothernia rossii* (linhas verdes) expostos a 0°C e 8°C durante 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas. As letras diferentes indicam diferenças ao longo do tempo de exposição em 0°C e 8°C. O jogo da velha indica interação entre os fatores tempo e temperatura ( $p \leq 0,05$ ). Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média).

TABELA 6 - NÍVEIS DA ATIVIDADE DA  $Na^+-K^+-ATPase$  RENAL E BRANQUIAL DE *Notothernia coriiceps* (NC) E *Notothernia rossii* (NR) SUBMETIDOS AO ESTRESSE TÉRMICO (MÉDIA  $\pm$  ERRO PADRÃO DA MÉDIA).

		T (°C)	2h	6h	12h	24h	72h	144h
NKA - renal	NC	0	3.11 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>	2.38 $\pm$ 0.57 <sup>a</sup>	3.00 $\pm$ 0.55 <sup>a</sup>	1.44 $\pm$ 0.18 <sup>b</sup>	0.99 $\pm$ 0.10 <sup>ab</sup>	1.96 $\pm$ 0.16 <sup>ab</sup>
		8	2.69 $\pm$ 0.49 <sup>a</sup>	3.40 $\pm$ 0.66 <sup>a</sup>	3.12 $\pm$ 0.55 <sup>a</sup>	1.06 $\pm$ 0.25 <sup>b</sup>	1.95 $\pm$ 0.15 <sup>ab</sup>	1.98 $\pm$ 0.20 <sup>ab</sup>
	NR	0	2.28 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	2.88 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>	2.39 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	1.50 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	1.69 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	1.46 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>
		8	2.00 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	2.37 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	2.27 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	1.56 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>	1.57 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	1.05 $\pm$ 0.34 <sup>b</sup>
NKA - branquial	NC	0	0.88 $\pm$ 0.22	0.98 $\pm$ 0.25	1.17 $\pm$ 0.20	0.60 $\pm$ 0.23	0.78 $\pm$ 0.19	0.90 $\pm$ 0.26
		8	0.65 $\pm$ 0.24	0.79 $\pm$ 0.29	1.48 $\pm$ 0.21	0.46 $\pm$ 0.05	0.58 $\pm$ 0.05	0.74 $\pm$ 0.07
	NR	0	0.16 $\pm$ 0.04	0.21 $\pm$ 0.03	0.20 $\pm$ 0.03	0.14 $\pm$ 0.02	0.15 $\pm$ 0.02	0.27 $\pm$ 0.05
		8	0.38 $\pm$ 0.04	0.14 $\pm$ 0.02	0.19 $\pm$ 0.01	0.68 $\pm$ 0.11 #	0.67 $\pm$ 0.10 #	1.00 $\pm$ 0.16 #

LEGENDA: Os níveis de atividade da  $Na^+-K^+-ATPase$  (NKA) renal e branquial são expressos em  $\mu mol$  de ATP/h/mg de proteína. T (°C) = temperatura. As letras diferentes indicam diferenças ao longo do tempo de exposição em 0°C e 8°C. O jogo da velha indica interação entre os fatores tempo e temperatura ( $p \leq 0,05$ ).

## 5 DISCUSSÃO

A temperatura é um dos fatores abióticos mais importantes, pois influencia e limita os aspectos fisiológicos, comportamentais e de distribuição dos peixes (AKHTAR et al., 2013; MINTENBECK et al., 2012). O sucesso da ictiofauna Antártica, em um ambiente estável e frio, pode ser visto como decorrente da otimização fisiológica (HOCHACHKA; SOMERO, 2002; WILSON et al., 2002; JOHNSTON, 1993; FIELDS; HOUSEMAN, 2004). Consequentemente, as alterações térmicas desencadeiam uma série de respostas, que podem refletir no custo metabólico de um organismo para a manutenção da homeostase (HARDEWIG; PÖRTNER; VAN DIJK, 2004; PÖRTNER, 2010).

Entre as alterações ocasionadas pela variação térmica pode-se citar o aumento dos níveis plasmáticos de cortisol que apresentam uma variabilidade significativa de acordo com a espécie, a duração e o agente estressor, com valores na faixa de 1 a 500 ng.ml<sup>-1</sup> (BARTON, 2002; GAMPERL et al., 1994; PANKHURST, 2011). Em peixes antárticos esta faixa encontra-se reduzida com valores entre 1 a 75 ng.ml<sup>-1</sup> (WHITELEY; EGGINTON, 1999), e em *N. rossii* e *N. coriiceps* os níveis de cortisol não ultrapassam os 30 ng.ml<sup>-1</sup>, sugerindo-se que o cortisol circulante varia de acordo com o habitat e o estilo de vida. O cortisol é um importante indicador primário de resposta ao estresse em espécies temperadas. Porém, para peixes antárticos ainda não há um consenso sobre o seu papel devido a aparente espécie-dependência e a escassez de estudos que avaliem os efeitos do estresse nos níveis de cortisol plasmáticos. No presente estudo, observou-se que apesar dos níveis de cortisol plasmático de *N. rossii* e *N. coriiceps* serem semelhantes, a resposta desencadeada frente à elevação térmica foi distinta. Em *N. rossii*, assim como em *Trematomus bernacchii* submetido ao aumento térmico (+1,6 e + 3,6°C) não se constatou aumento do cortisol (HUDSON et al., 2008). Já, em *N. coriiceps*, o aumento do cortisol a 8°C foi de até 6,5 x em relação à 0°C. Comportamento semelhante foi observado em *Pagothenia borchgrevinki* após o aumento da temperatura para 5 e 8°C (RYAN, 1995).

A mensuração do nível glicêmico é um método eficiente para avaliar o efeito do estresse em peixes (MOMMSEN et al., 1999; SCHRECK et al., 2016).

Neste estudo, a hiperglicemia em ambas as espécies indica que houve aumento da demanda energética frente ao estresse térmico. Em *N. coriiceps*, o aumento da glicemia a partir de 6 horas pode ter sido desencadeado como efeito do aumento do cortisol. Além disso, acredita-se que também ocorreu a liberação de catecolaminas o que pode ter ativado a via glicogenolítica no tecido hepático. Sem contar que, Forgati et al. (2017) observaram a redução nos níveis de glicogênio nos tecidos renal e branquial de *N. coriiceps* submetida a estresse térmico, constatando-se a utilização de reservas de glicogênio extra-hepáticas para o aumento da glicose plasmática. O aumento de catecolaminas já foi observado em duas espécies de nototenídeos, *Pagothenia borchgrevinki* e *Trematomus bernacchii* submetidas ao aumento térmico (10°C) por 10 min (FORSTER et al., 1998). Em *N. rossii*, o aumento transiente (6 e 12h) da glicemia pode ter sido desencadeado pela mobilização de reservas de glicogênio hepático pela via glicogenolítica. Rodrigues et al. (2015) ao submeterem *N. rossii* ao efluente do esgoto detectaram o potencial glicogenolítico devido ao aumento concomitante dos níveis de atividade da glicogênio fosforilase e da glicose-6-fosfatase no fígado. Os resultados de glicemia obtidos neste trabalho indicam que ambas as espécies necessitam de uma fonte de energia de fácil metabolização a fim de reestabelecer a homeostase. Assim como, os nototenídeos antárticos, *P. borchgrevinki* e *T. bernacchii*, que apresentaram resposta hiperglicemiante quando expostos ao choque térmico (+3°C e +6°C) a curto prazo (LOWE; DAVISON, 2005). A intensidade da resposta é maior em *N. coriiceps* que a de *N. rossii*, sugerindo-se que tanto o cortisol quanto as catecolaminas estimulam as respostas ao estresse. Ao longo do tempo não houve variação dos níveis de glicemia nos animais mantidos a 0°C, e estes se encontram dentro da faixa relatada para ambas as espécies em condição de natureza (RAGA et al., 2015) e de controle laboratorial (RODRIGUES et al., 2015). Isto nos indica que o único fator que contribuiu para os efeitos observados neste estudo foi o aumento térmico.

Os triglicerídeos atuam como fonte de energia sustentada durante as condições de estresse, podendo ser transportados dos tecidos de armazenamento pela corrente sanguínea ligados à albumina (ADAMU; KORI-SIAKPERE, 2011). Em *N. coriiceps*, provavelmente os triglicerídeos foram

recrutados a partir da lipólise do músculo branco, visto que a redução da citrato sintase, observada por Souza et al. (2018), pode indicar a limitação energética deste tecido. Além disso, o aumento dos níveis de cortisol está relacionado com o estímulo da glicерогênese hepática e consequente liberação de triglicerídeos no sangue. A redução de triglicerídeos ocorrida em 144 h sugere a utilização desta molécula como fonte de energia a fim de suprir o aumento da demanda energética de *N. coriiceps* frente ao estresse térmico. Em consequência, a maior duração do estresse térmico resulta em um comprometimento da capacidade metabólica devido a limitação de realocação de energia para os tecidos, levando à hiperglicemia e a um aumento do consumo de glicose pelos tecidos, como observado por Forgati et al. (2017) nas brânquias. Apesar de filogeneticamente próximas, os níveis de triglicerídeos plasmáticos de *N. rossii* são mais baixos que os de *N. coriiceps*, e não se observou influência da temperatura. Entretanto, ocorreu modulação ao longo do tempo, que pode indicar o efeito da alimentação neste biomarcador. Visto que, os triglicerídeos plasmáticos são modulados pela absorção de lipídios nos intestinos e pelo metabolismo dos ácidos graxos no fígado (DI MARCO et al., 2008).

Os níveis de colesterol diferem entre as espécies, entretanto ambas não foram afetadas pelo efeito da temperatura e do tempo, indicando que o estresse térmico a curto prazo não afetou o metabolismo desse lipídio. Estudos com outros agentes estressores indicam a alteração do perfil lipídico plasmático desses dois nototenídeos (RODRIGUES et al., 2013, 2015), sugerindo-se que a elevação do colesterol esteja relacionada ao comprometimento celular hepático e renal (ANANT; SURESH, 2015). Além disso, a LDH plasmática utilizada como marcadora de danos teciduais, não foi afetada pela temperatura em ambas as espécies.

Na literatura o piruvato plasmático é relatado como um substrato para a manutenção do metabolismo aeróbico (CRUZ et al., 2013; PAULINO et al., 2017) ou ainda como uma ferramenta antioxidante (DAS 2006; LEE et al., 2016). O piruvato liberado no plasma age com  $H_2O_2$ , de forma independentemente à ação das enzimas antioxidantes (LEE et al., 2016). Em *N. coriiceps*, o aumento pontual (2h, 8°C) da concentração de piruvato plasmático, ocorreu possivelmente devido à intensificação da glicólise e à menor utilização do piruvato no ciclo de Krebs.

Consequentemente se constatou o aumento do lactato plasmático, que neste estudo, pode ser proveniente do excesso de lactato acumulado nas brânquias de *N. coriiceps* demonstrando a ação do metabolismo anaeróbico frente a condição de hipóxia induzida pela temperatura (PÖRTNER et al., 2004; 2010; FORGATI et al., 2017).

A hiperlactemia pode ser relacionada com o comprometimento primário na absorção de oxigênio pelas brânquias (FORGATI et al., 2017), e aos processos de entrega de oxigênio aos tecidos. O aumento no lactato plasmático parece estar relacionado com a intensidade do estresse térmico, pois os níveis de lactato aumentaram cerca de 2x neste estudo, enquanto que ao submeter *N. coriiceps* à temperatura crítica máxima (CT<sub>max</sub>) há um aumento entre 5 a 10 vezes (BEERS; SIDELL, 2011; DEVOR et al., 2016). *N. rossii* apresentou elevação dos níveis de lactato plasmático apenas em 2h o que denota que ao longo do período experimental o metabolismo aeróbico foi mantido. Assim como quando submetidos ao estresse físico (DUNN; JOHNSTON, 1986) ou térmico (7°C) (STROBEL et al., 2012). Apesar de não haver diferença estatisticamente significativa entre os níveis de lactato das espécies analisadas, *N. coriiceps* apresentou maiores níveis de lactato que *N. rossii*, assim como observado quando submetidos a outras condições de estresse (EGGINTON, 1997; MARK et al., 2012). Provavelmente em 8°C, a hiperlactemia produz pH plasmático mais baixo em *N. coriiceps*. Vale ressaltar ainda, que as proteínas totais atuam como tampão não-bicarbonato na regulação ácido-base (STROBEL et al., 2012) e em *N. coriiceps* observou-se a redução dos níveis de proteínas totais. Como consequência ao pH mais ácido, há a redução da afinidade da hemoglobina pelo O<sub>2</sub> (PÖRTNER et al., 2004; PÖRTNER; LANGENBUCH; MICHAELIDIS, 2005). Além disso, foi demonstrado que o estresse térmico de 4°C promoveu aumento de alterações morfológicas nas células vermelhas de *N. coriiceps* e podem ser indício de resposta à condição de hipóxia a fim de aumentar a capacidade de carrear O<sub>2</sub> (ZAFALON-SILVA et al., 2017). Visto que, uma menor disponibilidade de oxigênio pode limitar a energia para a manutenção das funções fisiológicas.

Os níveis de proteínas totais (albumina e globulinas) são utilizados como indicadores da condição fisiológica do peixe por ser um dos componentes mais estáveis do sangue. *N. coriiceps* e *N. rossii* tiveram o metabolismo proteico

afetado de forma distinta pelo estresse térmico. Embora a concentração da albumina não tenha sido influenciada pela temperatura em ambas as espécies, provavelmente devido ao relevante papel na manutenção da pressão oncótica no plasma de vertebrados (ANDREEVA, 2010; PERES et al., 2015). As globulinas constituem um grupo heterogêneo de proteínas sendo agrupadas em várias classes, e estão envolvidas no metabolismo, transporte, coagulação, processo inflamatório e imune (HOSEINI et al., 2014). Em *N. coriiceps*, em consequência dos elevados níveis de cortisol durante o período experimental, observou-se menores níveis de globulinas, fato que na literatura é associado à deficiência do sistema imune, visto a possível redução de globulinas, como a lisozima e imunoglobulinas (AKHTAR et al., 2013; GHELICHPOUR et al., 2017).

O aumento do influxo de íons pode ser um indicador de estresse, devido à influência do sistema neuroendócrino no sistema osmorregulador dos peixes, função atribuída às brânquias, rim e intestino (WHITTAMORE; COOPER; WILSON, 2010). Portanto, a homeostase iônica ocorre ativamente através da ação conjunta de transportadores presentes nas membranas biológicas dos tecidos osmorreguladores (WHITTAMORE; COOPER; WILSON, 2010). Os peixes antárticos, assim como outros teleósteos marinhos são hipoosmóticos em relação à água do mar, resultando na perda de água para o meio externo, que é compensada pela ingestão de água do mar (PETZEL, 2005). Em peixes marinhos, a absorção dos íons divalentes,  $Mg^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$  e  $SO_4^{-2}$ , ocorre através da ingestão da água do mar e são secretados ativamente pelas vias intestinal e renal (BEYENBACH, 2004; WHITTAMORE et al., 2010; GROSELL, 2011). O  $Mg^{+2}$  é o principal cátion urinário, e neste estudo constatou-se que a temperatura influenciou de forma distinta as respostas de *N. coriiceps* e *N. rossii*, embora após 24h os níveis de  $Mg^{+2}$  retornaram à normalidade em ambas as espécies. Em *N. coriiceps*, observou-se uma transiente hipermagnesemia (12 h/8°C) que pode ser decorrente do aumento da absorção intestinal e/ou redução da excreção renal (PETZEL, 2005; RODRIGUES et al., 2015). Enquanto, em *N. rossii*, a redução dos níveis de magnésio em 6 e 12 h a 8°C pode ser consequência do aumento da excreção renal devido a ativação de transportadores envolvidos na secreção do  $Mg^{+2}$  (ISLAM et al., 2013), o que pode ser associado com os maiores níveis de atividade da HK e PFK renais em



6h a 8°C (FORGATI et al., 2017). Já, os íons monovalentes são ativamente regulados pelas brânquias (MCCORMICK, 2001; HWANG; LEE, 2007), sendo que a homeostase iônica ocorre ativamente através da ação conjunta de transportadores presentes nas membranas biológicas dos tecidos osmorreguladores (WHITTAMORE; COOPER; WILSON, 2010). Em *N. coriiceps*, a não modulação da atividade da NKA branquial e renal frente ao aumento da temperatura provavelmente afetou a manutenção do equilíbrio ácido-base, devido ao acúmulo de lactato branquial conforme observado por Forgati et al., 2017. A brânquia é o órgão responsável pela eliminação dos metabólitos ácidos e básicos através dos trocadores iônicos  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  e  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$  (TAKEI; HWANG, 2016). De forma distinta, em *N. rossii*, observou-se o aumento da NKA branquial a partir de 24h, o que pode ter contribuído para o balanço hidromineral, como observado pela manutenção dos íons  $\text{Cl}^-$ . Nos peixes antárticos *Trematomus bernacchii*, *Trematomus newnesi* (GONZALEZ-CABRERA et al., 1995) e *Pagothenia borchgrevinki* (PETZEL, 2005) submetidos ao aquecimento a 4°C por 35 dias constatou-se a elevação da atividade da NKA branquial e renal. Experimentos envolvendo o estresse hipossalino em *N. rossii* e *N. coriiceps* indicam a não modulação da atividade da NKA branquial e a redução da NKA renal nas primeiras horas (6h) a 8°C. Em 10/11 dias não se observam variações, viabilizando a manutenção da regulação osmótica e iônica frente ao estresse salino (RODRIGUES JR, 2010; ROMÃO; FREIRE; FANTA, 2001).

A manutenção dos níveis de atividade da NKA renal é energeticamente custosa e depende de um aporte eficiente de ATP (BALDISSERA et al., 2017). A redução dos níveis de atividade da NKA renal de *N. coriiceps* e *N. rossii* pode ser explicada pela redução dos níveis de atividade de enzimas do metabolismo de carboidratos renal, como a HK, PFK, CS e MDH observada por Forgati et al. (2017) e pela mesma tendência de diminuição dos níveis de fósforo inorgânico plasmático encontrada neste trabalho. Assim, a redução ao longo do tempo dos níveis de atividade da NKA renal e na concentração de  $\text{Ca}^{+2}$  de *N. coriiceps* e *N. rossii* pode ser decorrente do regime alimentar e a subsequente disponibilidade de substrato (FAGGIO et al., 2014, TIPSMARK; MADSEN, 2001). Vale lembrar ainda que, o intestino é o principal órgão osmorregulador do  $\text{Ca}^{2+}$ , sendo que os

rins apresentam papel fundamental no controle fino desse cátion (WILSON; GROSELL, 2003; GUERREIRO; FUENTES, 2007). Além disso, pode-se relacionar os efeitos observados no metabolismo do cálcio ao da albumina, já que esta proteína é um importante transportador de cálcio no sangue e variam de acordo com o pH sanguíneo (ENDRES; RUDE, 1999). *N. coriiceps* mantida em condições controle e experimentais exibiram hipocloremia em 144 h em relação ao grupo de 24 h, o que pode ser decorrente do efeito do confinamento (RUANE; HUISMAN; KOMEN, 2001), possivelmente mediada pela liberação de catecolaminas (MCDONALD; MILLIGAN, 1997). Assim como relatado para sunshine bass (DAVIS, 2004) submetidos às temperaturas entre 5 a 30°C por diferentes tempos. Em *N. coriiceps* e *N. rossii* coletados diretamente da natureza também não se observaram padrões sazonais dos eletrólitos plasmáticos (RAGA et al., 2015). Níveis anormais de  $Mg^{+2}$  associado ao  $Ca^{+2}$  e fósforo inorgânico plasmáticos podem levar a prejuízos ao crescimento e mineralização óssea em peixes (POLEDNIK et al., 2008). Além disso, podem levar ao acúmulo de lipídios, alterar a permeabilidade da membrana (PERES et al., 2015) e a manutenção da função mitocondrial (COWAN, 1995), trazendo prejuízos ao metabolismo energético.

Peixes antárticos vivem em condições de elevadas concentrações de oxigênio dissolvido e possuem alta densidade mitocondrial (STROBEL et al., 2013). Como mecanismos de adaptação às ações deletérias do oxigênio, apresentam um sistema de defesa antioxidante robusto, sugerindo-se que é limitada a capacidade de aumentar os níveis de antioxidantes em resposta ao estresse por calor (MUELLER et al., 2012). Os níveis de CAT permaneceram superiores aos do controle em todos os períodos testados, sugerindo aumento nos níveis de hidroperóxidos em *N. coriiceps* quando expostos ao estresse térmico. A SOD apresentou um aumento transitório, a 8°C, apenas no tempo de 6h quando comparado a temperatura controle. Dessa forma, sugere-se que a elevação da atividade da SOD está relacionada ao tempo de exposição, assim como observado no rim (FORGATI et al., 2017) e músculo branco (SOUZA et al., 2018) de *N. coriiceps*. Além disso, observa-se também que as respostas do sistema de defesa antioxidante no fígado (MACHADO et al., 2014), brânquias (FORGATI et al., 2017), coração (SOUZA et al., 2018) e encéfalo (PRZEPIURA,

2016) de *N. coriiceps* frente ao estresse térmico foram pontuais e transitórias. *N. coriiceps* submetida a temperatura crítica máxima (CTMax – 17,1°C) não apresentou alteração nos níveis de SOD e CAT cardíaca e muscular branca (MUELLER et al., 2012). Em *N. rossii*, não foram constatadas alterações nos níveis de SOD e CAT plasmáticos devido ao aumento térmico. Estes resultados podem sugerir que os níveis de enzimas antioxidantes presentes em cada tecido sejam suficientes para combater os efeitos do estresse oxidativo gerado pelo aumento térmico (ENZOR; PLACE, 2014) e para *N. coriiceps* a CAT plasmática é um bom indicador de efeitos do estresse térmico.

## 6 CONCLUSÕES

O aumento da demanda energética em *N. rossii* foi evidenciado pela hiperglicemia nas primeiras 12h, causada possivelmente pelo aumento dos níveis de catecolaminas, já que não se constatou alterações dos níveis de cortisol plasmáticos. Após este período os níveis glicêmicos foram semelhantes aos do controle; além disso, os demais parâmetros metabólicos e da defesa antioxidante não foram alterados. Sugere-se que *N. coriiceps* tenha menor robustez térmica que *N. rossii*, tendo em vista as alterações de parâmetros endócrinos, metabólicos e da defesa antioxidante em 8°C. As respostas secundárias como a hiperglicemia, a redução dos triglicerídeos, a hiperlactemia e o aumento da atividade antioxidante da CAT são importantes biomarcadores que foram modulados a fim de manter o suprimento energético e reduzir o estresse oxidativo em *N. coriiceps* frente ao estresse térmico. O aumento da temperatura modulou pontualmente e de forma inversa os níveis de magnésio no plasma de *N. coriiceps* e *N. rossii*, possivelmente pela alteração da taxa de absorção intestinal e/ou excreção renal. A partir de 24h observou-se o aumento da atividade da Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase branquial somente em *N. rossii* possivelmente a fim de auxiliar na homeostase iônica, mostrando que as duas espécies analisadas apresentam comportamentos fisiológicos distintos frente ao estresse térmico. *N. coriiceps*, diferente de *N. rossii*, é um potencial bioindicador na Baía do Almirantado, sendo o cortisol e a catalase plasmáticos bons biomarcadores de estresse térmico. A variabilidade das respostas dos parâmetros analisados ressalta a importância de maior conhecimento sobre aspectos ecológicos e fisiológicos de peixes, especialmente os antárticos, frente a agentes estressores, dentre eles a temperatura.

## REFERÊNCIAS

- ABELE, D.; PUNTARULO, S. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 138, n. 4, p. 405–415, 2004.
- ADAMU, K. M.; KORI-SIAKPERE, O. Effects of sublethal concentrations of tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaf dust on some biochemical parameters of Hybrid catfish (*Clarias gariepinus* and *Heterobranchus bidorsalis*). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 1, p. 183–196, 2011.
- AKHTAR, M. S.; PAL, A. K.; SAHU, N. P.; CIJI, A.; MAHANTA, P. C. Thermal tolerance, oxygen consumption and haemato-biochemical variables of *Tor putitora* juveniles acclimated to five temperatures. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 6, p. 1387–1398, 2013.
- ANANT, D.; SURESH, Z. Thermal power station effluent induced biochemical changes in the blood of freshwater fish, *Labeo rohita*. **Internation Journal of Life Sciences**, v. 3, n. 4, p. 341–350, 2015.
- ANDREEVA, A. M. The role of structural organization of blood plasma proteins in the stabilization of water metabolism in bony fish (Teleostei). **Journal of Ichthyology**, v. 50, n. 7, p. 552–558, 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1134/S0032945210070076>>.
- ARIGONY-NETO J.; SIMÕES, J. C.; BREMER, U. F. Implementation of the Admiralty Bay Geographic Information System, King George Island, Antarctica. **Pesquisa Antártica Brasileira**. v. 4, p. 187-190. 2004.
- BALDISSERA, M. D.; SOUZA, C. F.; JÚNIOR, G. B.; VERDI, C. M.; MOREIRA, K. L. S.; DA ROCHA, M. I. U. M.; DA VEIGA, M. L.; SANTOS, R. C. V.; VIZZOTTO, B. S.; BALDISSEROTTO, B. *Aeromonas caviae* alters the cytosolic and mitochondrial creatine kinase activities in experimentally infected silver catfish: Impairment on renal bioenergetics. **Microbial pathogenesis**, v. 110, p. 439-443, 2017.
- BARTON, B. A. Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, v. 42, n. 3, p. 517–525, 2002. Disponível em: <<https://academic.oup.com/icb/article-lookup/doi/10.1093/icb/42.3.517>>.
- BEERS, J. M.; SIDELL, B. D. Thermal tolerance of Antarctic notothenioid fishes correlates with level of circulating hemoglobin. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 84, n. 4, p. 353–362, 2011.
- BEUTLER, E. **Red cell metabolism: a manual of biochemical methods**. New York: Grune & Stratton, p.160, 1975.

BEYENBACH, K. W. Kidneys sans glomeruli. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 286, n. 5, p. F811-F827, 2004.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of rotein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAUN, M.; SIMÕES, J. C.; VOGT, S.; BREMER, U. F.; BLINDOW, N.; PFENDER, M.; SAURER, H.; AQUINO, F. E.; FERRON, F. A. An improved topographic database for King George Island: compilation, application and outlook. **Antarctic Science**, v. 13, n. 1, p. 41-52, 2001.

CARNEY ALMROTH, B.; ASKER, N.; WASSMUR, B.; ROSENGREN, M.; JUTFELT, F.; GRÄNS, A.; SUNDELL, K.; AXELSSON, M.; STURVE, J. Warmer water temperature results in oxidative damage in an antarctic fish, the bald notothen. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 468, p. 130–137, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jembe.2015.02.018>>.

CHEN, Z.; CHENG, C. H.; ZHANG, J.; CAO, L.; CHEN, L.; ZHOU, L.; JIN, Y.; YE, H.; DENG, C.; DAI, Z.; XU, Q.; HU, P.; SUN, S.; SHEN, Y.; CHEN, L. Transcriptomic and genomic evolution under constant cold in Antarctic notothenioid fish. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 35, p. 12944-12949, 2008.

CHENG, C. H.; YE, C. X.; GUO, Z. X.; WANG, A. L. Immune and physiological responses of pufferfish (*Takifugu obscurus*) under cold stress. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 64, p. 137–145, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2017.03.003>>.

COOK, A. J.; HOLLAND, P. R.; MEREDITH, M. P.; MURRAY, T.; LUCKMAN, A.; VAUGHAN, D. G. Ocean forcing of glacier retreat in the western Antarctic Peninsula. **Science**, v. 353, n. 6296, p. 283–286, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aae0017>>.

COWAN, J. A. Introduction to the biological chemistry of magnesium ion. The Biological Chemistry of Magnesium, p. 1–23, 1995.

CROUCH, R. K.; GANDY, S. C.; KINSEY, G. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. **Diabetes**, v. 30, p. 235-241, 1981.

DA CRUZ, A. L.; SILVA, H. R.; LUNDSTEDT, L. M.; SCHWANTES, A. R.; MORAES, G.; KLEIN, W.; FERNADES, M. N. Air-breathing behavior and physiological responses to hypoxia and air exposure in the air-breathing loricariid fish, *Pterygoplichthys anisitsi*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 243-256, 2013.

DAS, T.; PAL, A.K.; CHAKRABORTY, S. K.; MANUSH, S. M.; CHATTERJEE, N.; APTE, S. K. Metabolic elasticity and induction of heat shock protein 70 in

*Labeo rohita* acclimated to three temperatures. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 19, p. 1033-1039, 2006.

DAVIS, K. B. Temperature affects physiological stress responses to acute confinement in sunshine bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 139, n. 4, p. 433-440, 2004.

DEVOR, D. P.; KUHN, D. E.; O'BRIEN, K. M.; CROCKETT, E. L. Hyperoxia does not extend critical thermal maxima (CT<sub>max</sub>) in white- or red-blooded antarctic notothenioid fishes. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 89, n. 1, p. 1–9, 2016. Disponível em: <<http://www.journals.uchicago.edu/doi/10.1086/684812>>.

DI MARCO, P.; PRIORI, A.; FINOIA, M. G.; MASSARI, A.; MANDICH, A.; MARINO, G. Physiological responses of European sea bass *Dicentrarchus labrax* to different stocking densities and acute stress challenge. **Aquaculture**, v. 275, p. 319–328, 2008.

DONATTI, L.; FANTA, E. Influence of photoperiod on visual prey detection in the Antarctic fish *Notothenia neglecta* Nybelin. **Antarctic Science** v. 14, p. 146–150, 2002.

DUNN, J. F.; JOHNSTON, I. A. Metabolic constraints on burst-swimming in the Antarctic teleost *Notothenia neglecta*. **Marine Biology**, v. 91, p. 433–440, 1986.

EASTMAN, J.T. **Antarctic Fish Biology: Evolution in a Unique Environment**. San Diego: Academic Press, 1993.

EGGINTON, S. A comparison of the response to induced exercise in red- and white-blooded Antarctic fishes. **Journal of Comparative Physiology - B Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 167, n. 2, p. 129–134, 1997.

EGGINTON, S.; CAMPBELL, H. A. Cardiorespiratory responses in an Antarctic fish suggest limited capacity for thermal acclimation. **The Journal of Experimental Biology**, v. 219, n. 9, p. 1283–1286, 2016. Disponível em: <<http://jeb.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jeb.130963>>.

ENDRES, D.B.; RUDE, R.K. Mineral and bone metabolism. In: SAUNDERS, W.B. **Tietz textbook of clinical chemistry**. Philadelphia, USA: W.B. Saunders, p.1395-1457, 1999.

ENZOR, L. A.; PLACE, S. P. Is warmer better? Decreased oxidative damage in notothenioid fish after long-term acclimation to multiple stressors. **Journal of Experimental Biology**, v. 217, n. 18, p. 3301–3310, 2014. Disponível em: <<http://jeb.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jeb.108431>>.

FAGGIO, C.; PICCIONE, G.; MARAFIOTI, S.; ARFUSO, F.; FORTINO, G.; FAZIO, F. Metabolic response to monthly variations of *Sparus aurata* reared in

Mediterranean on-shore tanks. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 14, n. 2, p. 567-574, 2014.

FALCO, P.; ZAMBIANCHI, E. Near-surface structure of the Antarctic Circumpolar Current derived from World Ocean Circulation Experiment drifter data. **Journal of Geophysical Research: Oceans**, v. 116, n. C5, 2011.

FIELDS, P. A.; HOUSEMAN, D. E. Decreases in activation energy and substrate affinity in cold-adapted A4-lactate dehydrogenase: Evidence from the antarctic notothenioid fish *Chaenocephalus aceratus*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, n. 12, p. 2246–2255, 2004.

FORGATI, M. **Respostas metabólicas de brânquias de peixes antárticos frente ao estresse térmico**. 152 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

FORGATI, M.; KANDALSKI, P. K.; HERRERIAS, T.; ZALESKI, T.; MACHADO, C.; SOUZA, M. R. D. P.; DONATTI, L. Effects of heat stress on the renal and branchial carbohydrate metabolism and antioxidant system of Antarctic fish. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 187, n. 8, p. 1137–1154, 2017.

FORSTER, M. E.; DAVISON, W.; AXELSSON, M.; SUNDIN, L.; FRANKLIN, C. E.; GIESEG, S. Catecholamine release in heat-stressed Antarctic fish causes proton extrusion by the red cells. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 168, n. 5, p. 345-352, 1998.

FOX, J.; WEISBERG, S. **An R Companion to Applied Regression**. Thousand Oaks CA: Sage, second ed., 2011.

GAMPERL, A. K.; VIJAYAN, M. M.; BOUTILIER, R. G. Experimental control of stress hormone levels in fishes: techniques and applications. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 4, n. 2, p. 215–255, 1994.

GHELICHPOUR, M.; MIRGHAED, A. T.; MIRZARGAR, S. S.; JOSHAGHANI, H.; MOUSAVI, H. E. Plasma proteins, hepatic enzymes, thyroid hormones and liver histopathology of *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) exposed to an oxadiazin pesticide, indoxacarb. **Aquaculture Research**, v. 48, n. 11, p. 5666-5676, 2017.

GIBBS, A.; SOMERO, G. N. Pressure adaptations of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in gills of marine teleosts. **The Journal of Experimental Biology**, v. 143, p. 475-492, 1989.

GODDARD, P. B.; DUFOUR, C. O.; YIN, J.; GRIFFIES, S. M.; WINTON, M. CO<sub>2</sub>-Induced ocean warming of the antarctic continental shelf in an eddying global climate model. **Journal of Geophysical Research: Oceans**, 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/2017JC012849>>.

GONZALEZ-CABRERA, P. J.; DOWD, F.; PEDIBHOTLA, V. K.; ROSARIO, R.;



STANLEY-SAMUELSON, D.; PETZEL, D. Enhanced hypo-osmoregulation induced by warm-acclimation in antarctic fish is mediated by increased gill and kidney Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activities. **The Journal of experimental biology**, v. 198, n. Pt 11, p. 2279–2291, 1995.

GUERREIRO, P. M.; FUENTES, J. Control of calcium balance in fish. In: **Fish Osmoregulation**, p. 427-495, 2007.

GUYNN, S.; DOWD, F.; PETZEL, D. Characterization of gill Na/K-ATPase activity and ouabain binding in Antarctic and New Zealand nototheniid fishes. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 131, n. 2, p. 363–374, 2002.

HARDEWIG, I.; PÖRTNER, H. O.; VAN DIJK, P. How does the cold stenothermal gadoid *Lota lota* survive high water temperatures during summer? **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 174, n. 2, p. 149–156, 2004.

HARROWER J. R.; BROWN, C. H. BLOOD lactic acid. A micromethod adaptes to field collection of microliter samples. **Journal of Applied Physiology**. v. 32, p. 224-228, 1972.

HEISE, K.; ABELE, D. Response of blood parameters of the Antarctic fish *Notothenia coriiceps* (Richardson, 1844) to warming and hypoxia. In: **The Potter Cove coastal ecosystem, Antarctica. Synopsis of research performed 1999-2006 at the Dallmann Laboratory and Jubany Station, King George Island (Isla 25 de Mayo)**. Wiencke, C., Ferreyra, G., Abele, D. Marensi, S.(eds.) **Berichte zur Polarforsch.** 2008.

HOCHACHKA, P.W.; SOMERO, G. N. **Biochemical adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution**. New York: Oxford University Press, 2002.

HOSEINI, S. M.; HEDAYATI, A.; GHELICHPOUR, M. Plasma metabolites, ions and thyroid hormones levels, and hepatic enzymes[U+05F3] activity in Caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*) exposed to waterborne manganese. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 107, p. 84–89, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.05.002>>.

HUDSON, H. A.; BRAUER, P. R.; SCOFIELD, M. A.; PETZEL, D. H. Effects of warm acclimation on serum osmolality, cortisol and hematocrit levels in the Antarctic fish, *Trematomus bernacchii*. **Polar Biology**, v. 31, n. 8, p. 991–997, 2008.

HWANG, P. P.; LEE, T. H. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 148, n. 3, p. 479–497, 2007.

ISLAM, Z.; HAYASHI, N.; YAMAMOTO, Y.; DOI, H.; ROMERO, M. F.; HIROSE,

S.; KATO, A. Identification and proximal tubular localization of the  $Mg^{2+}$  transporter, Slc41a1, in a seawater fish. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 305, n. 4, p. R385-R396, 2013.

JAYASUNDARA, N.; HEALY, T. M.; SOMERO, G. N. Effects of temperature acclimation on cardiorespiratory performance of the Antarctic notothenioid *Trematomus bernacchii*. **Polar Biology**, v. 36, n. 7, p. 1047–1057, 2013.

JOHNSTON, I. A. Growth and metabolism in Antarctic fish. **Antarctic Special Topic**, n. December, p. 141–150, 1993.

JOHNSTON, I. A.; CALVO, J.; GUDERLEY, H.; FERNANDEZ, D.; PALMER, L. Latitudinal variation in the abundance and oxidative capacities of muscle mitochondria in perciform fishes. **Journal of Experimental Biology**, v. 201, p. 1–12, 1998.

KLEIN, R. D.; BORGES, V. D.; ROSA, C. E.; COLARES, E. P.; ROBALDO, R. B.; MARTINEZ, P. E.; BIANCHINI, A. Effects of increasing temperature on antioxidant defense system and oxidative stress parameters in the Antarctic fish *Notothenia coriiceps* and *Notothenia rossii*. **Journal of Thermal Biology**, v. 68, n. February, p. 110–118, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jtherbio.2017.02.016>>.

KULESZ, J. Ichthyofauna of lagoons of the Admiralty Bay (King George Island, Antarctica) in 1997. **Polish Archives of Hydrobiology**, v. 46, n. 2, p.173–184, 1999.

KÜLTZ, D.; SOMERO, G. N. Osmotic and thermal effects on in situ ATPase activity in permeabilized gill epithelial cells of the fish *Gillichthys mirabilis*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 198, p. 1883-1894, 1995.

LEE, J. Y.; ISHIDA, Y.; TAKAHASHI, T.; NAGANUMA, A.; HWANG, G. W. Transport of pyruvate into mitochondria is involved in methylmercury toxicity. **Scientific reports**, v. 6, 21528, 2016.

LOWE, C. J.; DAVISON, W. Plasma osmolarity, glucose concentration and erythrocyte responses of two Antarctic nototheniid fishes to acute and chronic thermal change. **Journal of Fish Biology**, v. 67, n. 3, p. 752–766, 2005.

LU, G. D. The metabolism of piruvic acid in normal and vitamin B-deficient state. I. A rapid specific and sensitive method for the estimation of blood piruvate. **Biochemical Journal**. v. 33, p. 249-254. 1939.

LU, Y.; WU, Z.; SONG, Z.; XIAO, P.; LIU, Y.; ZHANG, P.; YOU, F. Insight into the heat resistance of fish via blood: Effects of heat stress on metabolism, oxidative stress and antioxidant response of olive flounder *Paralichthys olivaceus* and turbot *Scophthalmus maximus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 58, p. 125–135, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2016.09.008>>.

MACHADO, C.; ZALESKI, T.; RODRIGUES, E.; CARVALHO, C. dos S.; CADENA, S. M. S. C.; GOZZI, G. J.; KREBSBACH, P.; RIOS, F. S. A.; DONATTI, L. Effect of temperature acclimation on the liver antioxidant defence system of the Antarctic nototheniids *Notothenia coriiceps* and *Notothenia rossii*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 172–173, n. 1, p. 21–28, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2014.02.003>>.

MARK, F. C.; LUCASSEN, M.; STROBEL, A.; BARRERA-ORO, E.; KOSCHNICK, N.; ZANE, L.; PATARNELLO, T.; PÖRTNER, H. O.; PAPETTI, C. Mitochondrial function in antarctic nototheniids with ND6 translocation. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, 2012.

MCCORMICK, S. D. Endocrine Control of Osmoregulation in Teleost Fish. **American Zoologist**, v. 41, n. 4, p. 781–794, 2001.

MEREDITH, M. P.; KING, J. C. Rapid climate change in the ocean west of the Antarctic Peninsula during the second half of the 20th century. **Geophysical Research Letters**, v. 32, n. 19, p. 1–5, 2005.

MINTENBECK, K.; BARRERA-ORO, E. R.; BREY, T.; JACOB, U.; KNUST, R.; MARK, F. C.; MOREIRA, E.; STROBEL, A.; ARNTZ, W. E. **Impact of Climate Change on Fishes in Complex Antarctic Ecosystems**. In: Global change in multispecies systems, v. 46, Elsevier, 2012. p. 351–426.

MOMMSEN, T. P.; VIJAYAN, M. M.; MOON, T. W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 9, n. 3, p. 211–268, 1999.

MUELLER, I. A.; GRIM, J. M.; BEERS, J. M.; CROCKETT, E. L.; O'BRIEN, K. M. Inter-relationship between mitochondrial function and susceptibility to oxidative stress in red- and white-blooded Antarctic notothenioid fishes. **Journal of Experimental Biology**, v. 214, n. 22, p. 3732–3741, 2011. Disponível em: <<http://jeb.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jeb.062042>>.

MUELLER, I. A.; DEVOR, D. P.; GRIM, J. M.; BEERS, J. M.; CROCKETT, E. L.; O'BRIEN, K. M. Exposure to critical thermal maxima increases oxidative stress in hearts of whitebut not red-blooded Antarctic notothenioid fishes. **Journal of Experimental Biology**, v. 215 (20), p. 3655–3664, 2012.

MUELLER, I.; HOFFMAN, M.; DULLEN, K.; O'BRIEN, K. Moderate elevations in temperature do not increase oxidative stress in oxidative muscles of antarctic notothenioid fishes. **Polar Biology**, v. 37, n. 3, p. 311–320, 2013.

NEAR T. J.; PESAVENTO, J. J.; CHENG, C. H. C. Phylogenetic investigations of Antarctic notothenioid fishes (Perciformes: Notothenioidei) using complete gene sequences of the mitochondrial encoded 16 S rRNA. **Molecular Phylogenetics**

**and Evolution**, v. 32, p.881–891, 2004. Disponível em: <10.1016/j.ympev.2004.01.002>.

PANKHURST, N. W. The endocrinology of stress in fish: An environmental perspective. **General and Comparative Endocrinology**, v. 170, n. 2, p. 265–275, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.07.017>.

PAULINO, M. G.; ROSSI, P. A.; VENTURINI, F. P.; TAVARES, D.; SOUZA, N. E. S.; SAKURAGUI, M. M.; MORAES, G.; TEREZAN, A. P.; FERNADES, J. B.; GIANI, A.; FERNANDES, M. N. Hepatotoxicity and metabolic effects of cellular extract of cyanobacterium *Radiocystis fernandoi* containing microcystins RR and YR on neotropical fish (*Hoplias malabaricus*). **Chemosphere**, v. 175, p. 431–439, 2017.

PERES, H.; COSTAS, B.; PEREZ-JIMENEZ, A.; GUERREIRO, I.; OLIVATELES, A. Reference values for selected hematological and serum biochemical parameters of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) juveniles under intensive aquaculture conditions. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 31, n. 1, p. 65–71, 2015.

PETZEL, D. Drinking in Antarctic fishes. **Polar Biology**, v. 28, n. 10, p. 763–768, 2005.

PODRABSKY, J. E.; SOMERO, G. N. Inducible heat tolerance in Antarctic notothenioid fishes. **Polar Biology**, v.30, n.1, p.39–43, 2006.

POLEDNÍK, L.; REHULKA, J.; KRANZ, A. PLEDNÍKOVÁ, K.; HLAVÁČ, V.; KAZIHNITKOVÁ, H. Physiological responses of over-wintering common carp (*Cyprinus carpio*) to disturbance by Eurasian otter (*Lutra lutra*). **Fish physiology and biochemistry**, v. 34, n. 3, p. 223–234, 2008.

PÖRTNER, H. O. Climate variation and physiology basis to temperature dependent biogeography: sistemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. **Comparative and Biochemical Physiology**, v. 132A, n. April 2001, p. 739–761, 2002.

PÖRTNER, H. O. Climate variability and the energetic pathways of evolution: The origin of endothermy in mammals and birds. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 77, p. 959–981, 2004. Disponível em: <doi 10.1086/423742>.

PÖRTNER, H. O.; LANGENBUCH, M.; MICHAELIDIS, B. Synergistic effects of temperature extremes, hypoxia, and increases in CO<sub>2</sub> on marine animals: From Earth history to global change. **Journal of Geophysical Research Oceans**, v. 110, C09S10, 2005. Disponível em: <doi 10.1029/2004jc002561>.

PÖRTNER, H. O. Climate-dependent evolution of Antarctic ectotherms: An integrative analysis. **Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, v. 53, n. 8–10, p. 1071–1104, 2006.

PÖRTNER, H.-O. Oxygen- and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems. **Journal of Experimental Biology**, v. 213, n. 6, p. 881–893, 2010. Disponível em: <<http://jeb.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jeb.037523>>.

PRZEPIURA, T. C. S. **Respostas metabólicas do encéfalo de peixes antárticos submetidos ao estresse térmico**. 101 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

RAGA, G.; PICHLER, H. A.; ZALESKI, T.; DA SILVA, F. B. V.; MACHADO, C.; RODRIGUES, E.; KAWALL, H. G.; RIOS, F. S.; DONATTI, L. Ecological and physiological aspects of the antarctic fishes *Notothenia rossii* and *Notothenia coriiceps* in Admiralty Bay, Antarctic Peninsula. **Environmental Biology of Fishes**, v. 98, n. 3, p. 775–788, 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10641-014-0311-2>>.

RODRIGUES JÚNIOR, E. **Impacto do fluoreto na resposta metabólica do peixe antártico *Notothenia rossii* (Richardson, 1844) aclimatado sob condições de estresse térmico e hiposmótico**. 90f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

RODRIGUES, E.; FEIJÓ-OLIVEIRA, M.; VANI, G. S.; SUDA, C. N. K.; CARVALHO, C. S.; DONATTI, L.; LAVRADO, H. P.; RODRIGUES, E. Interaction of warm acclimation, low salinity, and trophic fluoride on plasmatic constituents of the Antarctic fish *Notothenia rossii* Richardson, 1844. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 6, p. 1591–1601, 2013.

RODRIGUES, E.; FEIJÓ-OLIVEIRA, M.; SUDA, C. N. K.; VANI, G. S.; DONATTI, L.; RODRIGUES, E.; LAVRADO, H. P. Metabolic responses of the Antarctic fishes *Notothenia rossii* and *Notothenia coriiceps* to sewage pollution. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1205–1220, 2015.

ROMÃO, S.; FREIRE, C. A.; FANTA, E. Ionic regulation and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in gills and kidney of the Antarctic aglomerular cod icefish exposed to dilute sea water. **Journal of Fish Biology**, v. 59, n. 2, p. 463–468, 2001.

ROSSI, A.; BACCHETTA, C.; CAZENAVE, J. Effect of thermal stress on metabolic and oxidative stress biomarkers of *Hoplosternum littorale* (Teleostei, Callichthyidae). **Ecological Indicators**, v. 79, n. April, p. 361–370, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.04.042>>.

RUANE, N. M.; HUISMAN, E. A.; KOMEN, J. Plasma cortisol and metabolite level profiles in two isogenic strains of common carp during confinement. **Journal of Fish Biology**, v. 59, n. 1, p. 1–12, 2001.

RYAN, S. N. The effect of chronic heat stress on cortisol levels in the Antarctic fish *Pagothenia borchgrevinki*. **Experientia**, v. 51, n. 8 p. 768–774, 1995.

SANDERSFELD, T.; MARK, F. C.; KNUST, R. Temperature-dependent

metabolism in Antarctic fish: Do habitat temperature conditions affect thermal tolerance ranges? **Polar Biology**, v. 40, n. 1, p. 141–149, 2017.

SCHRECK, C. B.; TORT, L.; FARREL, A. P.; BRAUNER, C. J. **Biology of Stress in Fish**. Academic Press, 2016.

SCHIELZETH, H. Simple means to improve the interpretability of regression coefficient. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 1, p. 103- 113, 2010.

SOMERO, G. N.; DEVRIES, A. L. Temperature tolerance of some antarctic fishes. **Science**, v. 156, n. 3772, p. 257. 1967.

SOUZA, M. R. D. P.; HERRERIAS, T.; ZALESKI, T.; FORGATI, M.; KANDALSKI, P. K.; MACHADO, C.; SILVA, D. T.; PIECHNIK, C. A.; MOURA, M. O.; DONATTI, L. Heat stress in the heart and muscle of the Antarctic fishes *Notothenia rossii* and *Notothenia coriiceps*: Carbohydrate metabolism and antioxidant defence. **Biochimie**, v. 146, p. 43-55, 2018. doi: 10.1016/j.biochi.2017.11.010.

SPENCE, P.; HOLMES, R. M.; HOGG, A. M.; GRIFFIES, S. M.; STEWART, K. D.; ENGLAND, M. H. Localized rapid warming of West Antarctic subsurface waters by remote winds. **Nature Climate Change**, v. 7, n. 8, p. 595–603, 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nclimate3335>>.

STROBEL, A.; BENNECKE, S.; LEO, E.; MINTENBECK, K.; PÖRTNER, H. O.; MARK, F. C. Metabolic shifts in the Antarctic fish *Notothenia rossii* in response to rising temperature and PCO<sub>2</sub>. **Frontiers in Zoology**, v. 9, n. 1, p. 28, 2012.

STROBEL, A.; LEO, E.; PÖRTNER, H. O.; MARK, F. C. Elevated temperature and PCO<sub>2</sub> shift metabolic pathways in differentially oxidative tissues of *Notothenia rossii*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**. 10p, 2013.

TAKEI, Y.; HWANG, P. P. Homeostatic responses to osmotic stress. In: **Fish Physiology**. Academic Press, 2016. p. 207-249.

THUESEN, E. V.; MCCULLOUGH, K. D.; CHILDRESS, J. J. Metabolic enzyme activities in swimming muscle of medusae: is the scaling of glycolytic activity related to oxygen availability? **Journal of the Marine Biological Association of the UK**. v. 85, n. 3, 603-611, 2005.

TIPSMARK, C. K.; MADSEN, S. S. Rapid modulation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity in osmoregulatory tissues of a salmonid fish. **The Journal of experimental biology**, v. 204, n. Pt 4, p. 701–9, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11171352>>.

TURNER, J.; BARRAND, N. E.; BRACEGIRDLE, T. J.; CONVEY, P.; HODGSON, D. A.; JARVIS, M.; JENKINS, A.; MARSHALL, G.; MEREDITH, M. P.; ROSCOE, H.; SHANKLIN, J.; FRENCH, J.; GOOSSE, H.; GUGLIELMIN, M.; GUTT, J.; JACOBS, S.; KENNICUTT, M. C.; MASSON-DELMOTTE, V.;

MAYEWSKI, P.; NAVARRO, F.; ROBINSON, S.; SCAMBOS, T.; SPARROW, M.; SUMMERHAYES, C.; SPEER, K.; KLEPIKOV, A. Antarctic climate change and the environment: an update. **Polar Record**, v. 50, n. 3, p. 237–259, 2014. Disponível em: <[http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S0032247413000296](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0032247413000296)>.

VAUGHAN, D. G.; VAUGHAN, D. G.; MARSHALL, G. J.; CONNOLLEY, W. M.; PARKINSON, C.; MULVANEY, R.; HODGSON, D. A.; KING, J. C.; PUDSEY, C. J.; TURNER, J. Recent rapid regional climate warming on the Antarctic Peninsula. **Climatic change**, v. 60, n. 3, p. 243–274, 2003.

VERDE, C.; PARISI, E.; DI PRISCO, G. The evolution of thermal adaptation in polar fish. **Gene**, v. 385, p. 137–145, 2006.

WHITELEY, N. M.; EGGINTON, S. Antarctic fishes have a limited capacity for catecholamine synthesis. **The Journal of experimental biology**, v. 202, p. 3623–3629, 1999.

WHITTAMORE, J.M.; COOPER, C.A.; WILSON, R.W. HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion and CaCO<sub>3</sub> precipitation play major roles in intestinal water absorption in marine teleost fish in vivo. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 298 (4), p.877–886, 2010.

WILSON, R. S.; KUCHEL, L. J.; FRANKLIN, C. E.; DAVISON, W. Turning up the heat on subzero fish: Thermal dependence of sustained swimming in an Antarctic notothenioid. **Journal of Thermal Biology**, v. 27, n. 5, p. 381–386, 2002.

WILSON, R. W.; GROSELL, M. Intestinal bicarbonate secretion in marine teleost fish - source of bicarbonate, pH sensitivity, and consequences for whole animal acid-base and calcium homeostasis. **Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes**, v. 1618, n. 2, p. 163–174, 2003.

ZAFALON-SILVA, B.; ZEBRAL, Y. D.; BIANCHINI, A.; DA ROSA, C. E.; MARINS, L. F.; COLARES, E. P.; MARTINEZ, P. E.; BOBROWSKI, V. L.; ROBALDO, R. B. Erythrocyte nuclear abnormalities and leukocyte profile in the Antarctic fish *Notothenia coriiceps* after exposure to short- and long-term heat stress. **Polar Biology**, v. 40, p. 1755–1760, 2017.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

*N. rossii* e *N. coriiceps*, apesar de filo- e ecologicamente similares quando submetidas ao estresse térmico apresentaram diferentes respostas fisiológicas aferidas através de biomarcadores bioquímicos envolvidos no metabolismo energético, na defesa antioxidante e no metabolismo mineral. Permitindo concluir que *N. coriiceps* é um potencial bioindicador da Baía do Almirantado, devido a sua maior sensibilidade fisiológica frente ao estresse térmico que *N. rossii*.

Os resultados do capítulo I demonstram que apesar de *Notothenia rossii* manter o fator de condição durante o tempo experimental, houve uma maior demanda energética a fim de suprir os requisitos energéticos na temperatura de 8°C. Evidenciando que *N. rossii* apresentou mecanismos compensatórios permitindo a sobrevivência na temperatura de 8°C por 90 dias.

No capítulo II verificou-se que o metabolismo de carboidratos no rim de *N. rossii* foi alterado nas primeiras horas em 8°C, sendo que após 12h os níveis de atividade das enzimas glicolíticas e da via do ácido cítrico foram semelhantes aos observados no grupo controle até o final do experimento (144 h). Enquanto em *N. coriiceps*, apenas em 2h observou-se a redução dos níveis de atividade da HK, sugerindo que o equilíbrio entre a demanda de energia e a produção de ATP no tecido renal foi restaurado. A redução dos níveis de atividade das enzimas antioxidantes CAT, GST, GPx e GR nas primeiras horas de estresse térmico possivelmente contribuíram para o aumento da LPO em 72h em *N. rossii*. Enquanto, em *N. coriiceps* não se observou indícios de danos oxidativos.

No capítulo III constatou-se que *N. coriiceps* apresentou uma resposta fisiológica típica frente ao estresse, caracterizada pelo aumento do cortisol e modificações metabólicas a fim de subsidiar o aumento da demanda energética. Em *N. coriiceps*, observou-se também o aumento da atividade da SOD e da CAT plasmáticas, a fim de neutralizar a ação das espécies reativas ao oxigênio. Em *N. rossii*, a hiperglicemia transiente possivelmente foi desencadeada pela ação das catecolaminas, já que os níveis de cortisol não foram alterados. Somente em *N. rossii* verificou-se o aumento da atividade da NKA branquial (24-144h), a fim de auxiliar na manutenção do balanço hidromineral.



Portanto, os resultados obtidos nesta tese fornecem informações a respeito dos mecanismos fisiológicos ativados e a sensibilidade metabólica de *N. coriiceps* e *N. rossii* frente ao estresse térmico, contribuindo assim, para a obtenção de dados científicos que visam detectar e estimar os efeitos do estresse térmico de curto e longo prazo.

## REFERÊNCIAS

- ABELE, D.; TESCH, C.; WENCKE, P.; PÖRTNER, H.O. How do oxidative stress parameters relate to thermal tolerance in the Antarctic bivalve *Yoldia eightsi*? **Antarctic Science**, v. 13, p. 111-118, 2001.
- ABELE, D.; PUNTARULO, S. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 138, n. 4, p. 405-415, 2004.
- ADAMU, K. M.; KORI-SIAKPERE, O. Effects of sublethal concentrations of tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaf dust on some biochemical parameters of Hybrid catfish (*Clarias gariepinus* and *Heterobranchus bidorsalis*). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 1, p. 183-196, 2011.
- AKHTAR, M. S.; PAL, A. K.; SAHU, N. P.; CIJI, A.; MAHANTA, P. C. Thermal tolerance, oxygen consumption and haemato-biochemical variables of *Tor putitora* juveniles acclimated to five temperatures. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 6, p. 1387-1398, 2013.
- ALLAIN, C. C.; POON, L. S.; CHAN, C. S. G.; RICHMOND, W.; FU P. C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clinical Chemistry**, v. 20, p. 470-475, 1974.
- ALMEIDA-VAL, V. M. F.; VAL, A. L.; DUNCAN, W. P.; SOUZA, F. C. A.; PAULA-SILVA, M. N.; LAND, S. Scaling effects on hypoxia tolerance in the Amazon fish *Astronotus ocellatus* (Perciformes: Cichlidae): contribution of tissue enzyme levels. **Comp Biochemistry and Physiology**, v. 125, p. 219-226, 2000.
- ANANT, D.; SURESH, Z. Thermal power station effluent induced biochemical changes in the blood of freshwater fish, *Labeo rohita*. **Internation Journal of Life Sciences**, v. 3, n. 4, p. 341-350, 2015.
- ANDREEVA, A. M. The role of structural organization of blood plasma proteins in the stabilization of water metabolism in bony fish (Teleostei). **Journal of Ichthyology**, v. 50, n. 7, p. 552-558, 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1134/S0032945210070076>>.
- ANSALDO, M.; LUQUET, C.M.; EVELSONN, P.A.; POLO, J.M.; LLESUY, S. Antioxidant levels from different antarctic fish caught around South Georgia Island and Shag Rocks. **Polar Biology**, v.23, p.160-165, 2000.
- ARIGONY-NETO J.; SIMÕES, J. C.; BREMER, U. F. Implementation of the Admiralty Bay geographic information system, King George Island, Antarctica. **Pesquisa Antártica Brasileira**. v. 4, p. 187-190. 2004.
- ARNTZ, W. E.; BREY, T.; GALLARDO, V.A. Antarctic marine biodiversity: an overview. In: Battaglia B, Valencia J, Walton DWH (eds) **Antarctic communities: species, structure and survival**. Cambridge University Press,

Cambridge, pp 3–14, 1997.

ATCM XXXVII. Final report of the thirty-seventh antarctic treaty consultative meeting. Management Plan for Antarctic Specially Managed Area No. 1 Admiralty Bay, King George Island. Measure 14, 2014.

BAGNYUKOVA, T. V.; STOREY, K. B.; LUSHCHAK, V. I. Induction of oxidative stress in *Rana ridibunda* during recovery from winter hibernation. **Journal of Thermal Biology**, v. 28, p. 21-28, 2003.

BALDISSERA, M. D.; SOUZA, C. F.; JÚNIOR, G. B.; VERDI, C. M.; MOREIRA, K. L. S.; DA ROCHA, M. I. U. M.; DA VEIGA, M. L.; SANTOS, R. C. V.; VIZZOTTO, B. S.; BALDISSEROTTO, B. *Aeromonas caviae* alters the cytosolic and mitochondrial creatine kinase activities in experimentally infected silver catfish: Impairment on renal bioenergetics. **Microbial pathogenesis**, v. 110, p. 439-443, 2017.

BALDWIN, J.; ELIAS, J. P.; WELLS, R. M. G.; DONOVAN, D. A. Energy metabolism in the tropical abalone, *Haliotis asinina* Linné: comparisons with temperate abalone species. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 342, p. 213–225, 2007.

BARBOSA, M.C.; JATOBÁ, A.; VIEIRA, F. N. Cultivation of juvenile fat snook (*Centropomus parallelus* Poey, 1860) fed probiotic in laboratory conditions. **Brazilian Archives of Biology Technology**, v. 54, p. 795-801, 2011.

BARGELLONI, L.; MARCATO, S.; PATARNELLO, T. Antarctic fish hemoglobins: evidence for adaptive evolution at subzero temperature. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 15, p. 8670-8675, 1998.

BARRERA-ORO, E. R. Review: the role of fish in the Antarctic marine food web: differences between inshore and offshore waters in the southern Scotia Arc and west Antarctic Peninsula. **Antarctic Science**, v. 14, p.293–309, 2002.

BARRERA-ORO, E.R.; WINTER, D.J. Age composition and feeding ecology of early juvenile *Notothernia rossii* (Pisces, Nototheniidae) at Potter Cove, South Shetland Islands, Antarctic. **Antarctic Science**, v.20, n.4, p.339-341, 2008.

BARRETT, P.J. Cooling a continent. **Nature**, v.421, p.221-223, 2003.

BARTON, B. A. Stress in Fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, v. 42, n. 3, p. 517–525, 2002. Disponível em: <<https://academic.oup.com/icb/article-lookup/doi/10.1093/icb/42.3.517>>.

BEERS, J. M.; SIDELL, B. D. Thermal tolerance of Antarctic notothenioid fishes correlates with level of circulating hemoglobin. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 84, n. 4, p. 353–362, 2011.

BEERS, J. M.; JAYASUNDARA, N.. Antarctic notothenioid fish: what are the

future consequences of 'losses' and 'gains' acquired during long-term evolution at cold and stable temperatures?. **Journal of Experimental Biology**, v. 218, n. 12, p. 1834-1845, 2015.

BEUTLER, E. **Red cell metabolism: a manual of biochemical methods**. New York: Grune & Stratton, p.160, 1975.

BEYENBACH, K. W. Kidneys sans glomeruli. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 286, n. 5, p. F811-F827, 2004

BIDINOTO, P. M.; MORAES, G.; SOUZA, R. H. S. Hepatic glycogen and glucose in eight tropical fresh water teleost fish: a procedure for field determinations of micro samples. **Boletim Técnico CEPTA Pirassununga** v. 10, p. 53-60, 1997.

BILYK, K. T.; DE VRIES, A. L. Heat tolerance and its plasticity in Antarctic fishes. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, v. 158, p. 382-90, 2011.

BILYK, K. T.; EVANS, C. W.; DEVRIES, A. L. Heat hardening in Antarctic notothenioid fishes. **Polar Biology**, v. 35, n. 9, p. 1447–1451, 2012.

BLASCO, J.; GUTIÉRREZ, J.; FERNÁNDEZ, J.; PLANAS, J. The effect of temperature on immunoreactive glucagon plasma level in carp *Cyprinus carpio*. **Revista Espanola de Fisiología**, v. 44, p. 157–162, 1988.

BLASCO, J.; MARIMÓN, I.; VIAPLANA, I.; FERNÁNDEZ-BORRÁS, J. Fate of plasma glucose in tissues of brown trout in vivo: Effects of fasting and glucose loading. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 24, n. 3, p. 247–258, 2001.

BOOTH, D. J.; BOND, N.; MACREADIE, P. Detecting range shifts among Australian fishes in response to climate change. **Marine and Freshwater Research**, v. 62, n. 9, p. 1027–1042, 2011.

BOYCE, S. J.; CLARKE, A. Effect of body size and ration on specific dynamic action in the Antarctic plunderfish, *Harpagifer antarcticus* Nybelin 1947. **Physiological Zoology**, v. 70, p. 679-690, 1997.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAUN, M.; SIMÕES, J. C.; VOGT, S.; BREMER, U. F.; BLINDOW, N.; PFENDER, M.; SAURER, H.; AQUINO, F. E.; FERRON, F. A. An improved topographic database for King George Island: compilation, application and outlook. **Antarctic Science**, v. 13, n. 1, p. 41-52, 2001.

BRODTE, E.; KNUST, R.; PÖRTNER, H. O. Temperature-dependent energy allocation to growth in Antarctic and boreal eelpout (Zoarcidae). **Polar Biology**, v. 30, n. 1, p. 95–107, 2006.

BRODTE, E.; GRAEVE, M.; JACOB, U.; KNUST, R.; PÖRTNER, H. O.

Temperature-dependent lipid levels and components in polar and temperate eelpout (Zoarcidae). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 34, n. 3, p. 261–274, 2008.

BUCKLEY, B. A.; HEDRICK, M. S.; HILLMAN, S. S. Cardiovascular oxygen transport limitations to thermal niche expansion and the role of environmental PO<sub>2</sub> in Antarctic notothenioid fishes. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 87, n. 4, p. 499-506, 2014.

BUCOLO, G.; DAVID, H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. **Clinical Chemistry**, v. 19, p. 476-482, 1973.

BURCHETT, M. S. Morphology and morphometry of the Antarctic Nototheniid *Notothenia rossii marmorata*. **British Antarctic Survey Bulletin**, v. 58, p. 71-81, 1983.

CALI, J. P.; BOWERS, G. N.; YOUNG, J. D. S. (1973) A referee method for the determination of total calcium in serum. **Clinical Chemistry**, v. 19, p. 1208-1213.

CALÌ, F.; RIGINELLA, E.; LA MESA, M.; MAZZOLDI, C. Life history traits of *Notothenia rossii* and *N. coriiceps* along the southern Scotia Arc. **Polar Biology**, v. 40, n. 7, p. 1409–1423, 2017.

CAMPBELL, H. A.; FRASER, K. P. P.; BISHOP, C. M.; PECK, L. S.; EGGINTON, S. Hibernation in an Antarctic fish: on ice for winter. **PLoS ONE**, v. 3, p. e1743, 2008.

CAMPOS, M., MOTHES, B., MENDES, I.L.V. Antarctic sponges (Porifera, Demospongiae) of the South Shetland Islands and vicinity. Part I. Spirophorida, Hadromerida, Halichondrida and Haplosclerida. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.24, p.687-708, 2007.

CARDOSO, W.E. **Morfologia e Ultraestrutura do intestino do peixe antártico *Notothenia rossii* RICHARDSON, 1844 e sua relação com o hábito alimentar**. 2005. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular). Universidade Federal do Paraná.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 250, p.5475–5480, 1975.

CARNEY ALMROTH, B.; ASKER, N.; WASSMUR, B.; ROSENGREN, M.; JUTFELT, F.; GRÄNS, A.; SUNDELL, K.; AXELSSON, M.; STURVE, J. Warmer water temperature results in oxidative damage in an antarctic fish, the bald notothen. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 468, p. 130–137, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jembe.2015.02.018>>.

CHEN, Z.; CHENG, C. H.; ZHANG, J.; CAO, L.; CHEN, L.; ZHOU, L.; JIN, Y.; YE, H.; DENG, C.; DAI, Z.; XU, Q.; HU, P.; SUN, S.; SHEN, Y.; CHEN, L. Transcriptomic and genomic evolution under constant cold in Antarctic

notothenioid fish. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 35, p. 12944-12949, 2008.

CHENG, C. C.; DEVRIES, A. L. The role of antifreeze glycopeptides and peptides in the freezing avoidance of cold-water fish. In: **Life under extreme conditions**. Springer, Berlin, Heidelberg, 1991. p. 1-14.

CHENG, C.H.; CHEN, L.; NEAR, T. J.; JIN, Y. Functional antifreeze glycoprotein genes in temperate-water New Zealand nototheniid fish infer an Antarctic evolutionary origin. **Molecular Biology and Evolution**, v. 20, n. 11, p.1897-1908, 2003.

CHENG, C. H.; YE, C. X.; GUO, Z. X.; WANG, A. L. Immune and physiological responses of pufferfish (*Takifugu obscurus*) under cold stress. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 64, p. 137–145, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2017.03.003>>.

CHILDRESS, J. J.; SOMERO, G. N. Depth-related enzymic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts. **Marine Biology**, v. 52, p. 273-283, 1979.

CIARDELLO, M.; CAMARDELLA, L.; DI PRISCO, G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase from the blood cells of two Antarctic teleosts: correlation with cold adaptation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1250, p. 76–82, 1995.

CLARK, T. D.; SANDBLOM, E.; JUTFELT, F. Aerobic scope measurements of fishes in an era of climate change: respirometry, relevance and recommendations. **Journal of Experimental Biology**, v. 216, n. 15, p. 2771-2782, 2013.

CLARKE, A. 1988 Seasonality in the Antarctic marine ecosystem. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v.90, p.461-473.

CLARKE, A. What is cold adaptation and how should we measure it? **American Zoologist**, v. 31, p. 81-92, 1991.

CLARKE, A.; JOHNSTON, I. A. Evolution and adaptive radiation of Antarctic fishes. **Tree**, v.11, p.212-218, 1996.

CLARKE, A.; MURPHY, E.J.; MEREDITH, M. P.; KING, J. C.; PECK, L. S.; BARNES, D. K. A.; SMITH, R. C. Climate change and the marine ecosystem of the western Antarctic Peninsula. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 362, p. 149-166, 2007.

COGGAN, R. Growth:Ration relationships in the antarctic fish *Notothenia coriiceps* Richardson maintained under different conditions of temperature and photoperiod. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 210, n. 1, p. 23–35, 1997.

COOK, A. J.; HOLLAND, P. R.; MEREDITH, M. P.; MURRAY, T.; LUCKMAN, A.;

VAUGHAN, D. G. Ocean forcing of glacier retreat in the western Antarctic Peninsula. **Science**, v. 353, n. 6296, p. 283–286, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aae0017>>.

CORBISIER, T. N.; PETTI, M. A. V.; SKOWRONSKI, R. S. P.; BRITO, T. A. S. Trophic relationships in the nearshore zone of Martel Inlet (King George Island, Antarctica):  $\delta^{13}\text{C}$  stable-isotope analysis. **Polar Biology**, v. 27, p. 75-82, 2004.

COWLES, R. B.; BOGERT, C. M. A preliminary study of the thermal requirements of desert reptiles. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 83, 265 - 296, 1944.

CRAWFORD, R. E. Effect of starvation and experimental feeding on the proximate composition and caloric content of an antarctic teleost, *Notothenia coriiceps neglecta*. **Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology**, v. 62, n. 2, p. 321–326, 1979.

CROUCH, R. K.; GANDY, S. C.; KINSEY, G. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. **Diabetes**, v. 30: p. 235-241, 1981.

CIARDELLO, M.; CAMARDELLA, L.; DI PRISCO, G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase from the blood cells of two Antarctic teleosts: correlation with cold adaptation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1250, p. 76–82, 1995.

CROCKETT, E. L. Antioxidant potential is positively correlated with mitochondrial enzyme activity in Antarctic and non-Antarctic notothenioid fishes. **Polar biology**, v. 34, n. 1, p. 113-118, 2011.

DA CRUZ, A. L.; SILVA, H. R.; LUNDSTEDT, L. M.; SCHWANTES, A. R.; MORAES, G.; KLEIN, W.; FERNADES, M. N. Air-breathing behavior and physiological responses to hypoxia and air exposure in the air-breathing loricariid fish, *Pterygoplichthys anisitsi*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 243-256, 2013.

DALVI, R. S.; DAS, T.; DEBNATH, D.; YENGKOKPAM, S.; BARUAH, K.; TIWARI, L. R.; PAL, A. K. Metabolic and cellular stress responses of catfish, *Horabagrus brachysoma* (Günther) acclimated to increasing temperatures. **Journal of Thermal Biology**, v. 65, n. February, p. 32–40, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jtherbio.2017.02.003>>.

DAS, T.; PAL, A.K.; CHAKRABORTY, S. K.; MANUSH, S. M.; CHATTERJEE, N.; APTE, S. K. Metabolic elasticity and induction of heat shock protein 70 in *Labeo rohita* acclimated to three temperatures. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 19, p. 1033-1039, 2006.

DAVIS, K. B. Temperature affects physiological stress responses to acute confinement in sunshine bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 139, n. 4, p. 433-440, 2004.

DEVOR, D. P.; KUHN, D. E.; O'BRIEN, K. M.; CROCKETT, E. L. Hyperoxia does not extend critical thermal maxima ( $CT_{max}$ ) in white- or red-blooded antarctic notothenioid fishes. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 89, n. 1, p. 1–9, 2016. Disponível em: <<http://www.journals.uchicago.edu/doi/10.1086/684812>>.

DE WITT, H. Coastal and deep-water benthic fishes of the Antarctic. In: BUSHNELL, V. C. **Antarctic Map Folio Series**, Folio 15, New York: American Geographical Society, p.1-10, 1971.

DI MARCO, P.; PRIORI, A.; FINOIA, M. G.; MASSARI, A.; MANDICH, A.; MARINO, G. Physiological responses of European sea bass *Dicentrarchus labrax* to different stocking densities and acute stress challenge. **Aquaculture**, v. 275, p. 319–328, 2008.

DI PRISCO, G.; MARESCA, B.; TOTA, B. **Biology of antarctic fish**. Spriger-Verlag, Berlin, 1991.

DI PRISCO, G. Molecular adaptations in Antarctic fish hemoglobins. In: di Prisco G, Pisano E, Clarke A. Eds. **Fishes of Antarctica**. A Biological Overview. Springer, Milano, pp. 339–353, 1998.

DI PRISCO, G.; COCCA, E.; PARKER, S. K.; DETRICH III, H. W. Tracking the evolutionary loss of hemoglobin expression by the white-blooded Antarctic icefishes. **Gene**, v. 295, n. 2, p. 185-191, 2002.

DONATTI, L.; FANTA, E. Influence of photoperiod on visual prey detection in the Antarctic fish *Notothenia neglecta* Nybelin. **Antarctic Science** v. 14, p. 146–150, 2002.

DOUMAS, B.T.; WATSON, W. A.; BIGGS, H. G. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. **Clinica Chimica Acta**, v. 31, p. 87-96, 1971.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-335, 1956.

DUHAMEL, G.; KOCK, K. H.; BAIGUERIAS, E.; HUREAU, J. C. Reproduction in fish of the Weddell Sea. **Polar Biology**, v. 13, n. 3, p. 193-200, 1993.

DUHAMEL, G.; HULLEY, P. A.; CAUSSE, R.; KOUBBI, P.; VACCHI, M.; PRUVOST, P. et al. In DE BROYER, C.; KOUBBI, P.; GRIFFITHS, H. J.; RAYMOND, B.; UDEKEM D'ACOS, C. et al. (eds.). **Biogeographic Atlas of the Southern Ocean**. Scientific Committee on Antarctic Research, Cambridge, pp. 328-362.

DUNN, J. F.; JOHNSTON, I. A. Metabolic constraints on burst-swimming in the Antarctic teleost *Notothenia neglecta*. **Marine Biology**, v. 91, p. 433-440, 1986.



EASTMAN, J. T. **Antarctic Fish Biology: Evolution in a Unique Environment**. San Diego: Academic Press, 1993.

EASTMAN, J. T.; EAKIN, R.R. An updated species list for notothenioid fish (Perciformes: Notothenioidei), with comments on Antarctic species. **Archive of Fishery and Marine Research**, v. 48, n. 1, p. 11-20, 2000.

EASTMAN, J. T.; MCCUNE A. R. Fishes on the Antarctic continental shelf: evolution of a marine species flock? **Journal of Fish Biology**, v. 57, p. 84–102, 2000.

EASTMAN, Joseph T. The nature of the diversity of Antarctic fishes. **Polar biology**, v. 28, n. 2, p. 93-107, 2005.

EASTMAN, J. T.; BARRERA-ORO, E.; MOREIRA, E. Adaptive radiation at a low taxonomic level: Divergence in buoyancy of the ecologically similar Antarctic fish *Notothenia coriiceps* and *N. rossii*. **Marine Ecology Progress Series**, v. 438, p. 195–206, 2011.

EGGINTON, S.; TAYLOR, E. W.; WILSON, R. W.; JOHNSTON, I. A.; MOON, T. W. Stress response in the Antarctic teleosts (*Notothenia neglecta* Nybelin and *N. rossii* Richardson). **Journal of Fish Biology**, v. 38, p. 225–235, 1991.

EGGINTON, S. Blood rheology of Antarctic fishes: viscosity adaptations at very low temperatures. **Journal of Fish Biology**, v. 48, n. 3, p. 513-521, 1996.

EGGINTON, S. A comparison of the response to induced exercise in red- and white-blooded Antarctic fishes. **Journal of Comparative Physiology - B Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 167, n. 2, p. 129–134, 1997.

EGGINTON, S.; CAMPBELL, H. A. Cardiorespiratory responses in an Antarctic fish suggest limited capacity for thermal acclimation. **The Journal of Experimental Biology**, v. 219, n. 9, p. 1283–1286, 2016. Disponível em: <<http://jeb.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jeb.130963>>.

ENDRES, D.B.; RUDE, R.K. Mineral and bone metabolism. In: SAUNDERS, W.B. **Tietz textbook of clinical chemistry**. Philadelphia, USA: W.B. Saunders, p.1395-1457, 1999.

ENGELUND, M. B.; MADSEN, S. S. The role of aquaporins in the kidney of euryhaline teleosts. **Frontiers in Physiology**, v. 2, p. 51, 2011.

ENZOR, L. A.; PLACE, S. P. Is warmer better? Decreased oxidative damage in notothenioid fish after long-term acclimation to multiple stressors. **Journal of Experimental Biology**, v. 217, n. 18, p. 3301–3310, 2014. Disponível em: <<http://jeb.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jeb.108431>>.

FAGGIO, C.; PICCIONE, G.; MARAFIOTI, S.; ARFUSO, F.; FORTINO, G.; FAZIO, F. Metabolic response to monthly variations of *Sparus aurata* reared in

Mediterranean on-shore tanks. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 14, n. 2, p. 567-574, 2014.

FATHI, A. R.; KRAUTHEIM, A.; LUCKE, S.; BECKER, K.; STEINFELDE, R. H. J. Nonradioactive technique to measure protein phosphatase 2A-like activity and its inhibition by drugs in cell extracts. **Analytical Biochemistry**, v. 310, n. 2, p. 208-214, 2002.

FEDERICI, G.; SHAW, B.J., HANDY, R.D. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. **Aquatic Toxicology**, v. 84, p. 415-430, 2007.

FERGUSON, H.W. **Systemic pathology of fish: a text and atlas of normal tissues in teleosts and their responses in disease**. 2<sup>nd</sup> ed. London: Scotian, 2006. 366p.

FIELDS, P. A.; HOUSEMAN, D. E. Decreases in activation energy and substrate affinity in cold-adapted A4-lactate dehydrogenase: Evidence from the antarctic notothenioid fish *Chaenocephalus aceratus*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, n. 12, p. 2246–2255, 2004.

**Fish Base**. Disponível em: <<http://www.fishbase.org/>>. Acesso em: dezembro de 2017.

FOLCH, J.; LESS, M.; STANLEY, S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 497-509, 1957.

FORGATI, M. **Respostas metabólicas de brânquias de peixes antárticos frente ao estresse térmico**. 152 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

FORGATI, M.; KANDALSKI, P. K.; HERRERIAS, T.; ZALESKI, T.; MACHADO, C.; SOUZA, M. R. D. P.; DONATTI, L. Effects of heat stress on the renal and branchial carbohydrate metabolism and antioxidant system of Antarctic fish. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 187, n. 8, p. 1137–1154, 2017.

FORSTER, M. E.; DAVISON, W.; AXELSSON, M.; SUNDIN, L.; FRANKLIN, C. E.; GIESEG, S. Catecholamine release in heat-stressed Antarctic fish causes proton extrusion by the red cells. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 168, n. 5, p. 345-352, 1998.

FOSTER, T. D. The marine environment. In: LAWS, R.M. (Ed.) **Antarctic ecology**. London: Academic Press, v. 2, p.345-371, 1984.

FOX, J.; WEISBERG, S. **An R Companion to Applied Regression**. Thousand Oaks CA: Sage, second ed., 2011.

FRANKLIN, C. E.; DAVISON, W.; SEEBACHER, F. Antarctic fish can compensate for rising temperatures: thermal acclimation of cardiac performance in *Pagothenia borchgrevinki*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 210, p. 3068-3074, 2007.

GAMPERL, A. K.; VIJAYAN, M. M.; BOUTILIER, R. G. Experimental control of stress hormone levels in fishes: techniques and applications. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 4, n. 2, p. 215–255, 1994.

GHELICHPOUR, M.; MIRGHAED, A. T.; MIRZARGAR, S. S.; JOSHAGHANI, H.; MOUSAVI, H. E. Plasma proteins, hepatic enzymes, thyroid hormones and liver histopathology of *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) exposed to an oxadiazin pesticide, indoxacarb. **Aquaculture Research**, v. 48, n. 11, p. 5666-5676, 2017.

GIBBS, A.; SOMERO, G. N. Pressure adaptations of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in gills of marine teleosts. **The Journal of Experimental Biology**, v. 143, p. 475-492, 1989.

GIESEG, S. P.; CUDDIHY, S.; HILL, J. V.; DAVISON, W. A comparison of plasma vitamin C and E levels in two Antarctic and two temperate water fish species. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 125, p. 371-378, 2000.

GIROTTI, A. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. **The Journal of Lipid Research**, v. 39, p.1529-1642, 1998.

GODDARD, P. B.; DUFOUR, C. O.; YIN, J.; GRIFFIES, S. M.; WINTON, M. CO<sub>2</sub>-Induced ocean warming of the antarctic continental shelf in an eddying global climate model. **Journal of Geophysical Research: Oceans**, 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/2017JC012849>>.

GON, O.; HEEMSTRA, P. C. Fishes of the Southern Ocean. **Institute of Ichthyology**, v.462, 1990.

GONZALEZ-CABRERA, P. J.; DOWD, F.; PEDIBHOTLA, V. K.; ROSARIO, R.; STANLEY-SAMUELSON, D.; PETZEL, D. Enhanced hypo-osmoregulation induced by warm-acclimation in antarctic fish is mediated by increased gill and kidney Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activities. **The Journal of experimental biology**, v. 198, n. Pt 11, p. 2279–2291, 1995.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. S.; DAVID, M. M. Determination of serum protein by means of the biuret reaction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 177, p. 751-766, 1949.

GRIM, J. M.; Simonik, E. A.; Semones, M. C.; Kuhn, D. E.; Crockett, E. L. The glutathione-dependent system of antioxidant defense is not modulated by temperature acclimation in muscle tissues from striped bass, *Morone saxatilis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 164, n. 2, p. 383-390, 2013.

GUERREIRO, P. M.; FUENTES, J. Control of calcium balance in fish. In: **Fish**

**Osmoregulation**, p. 427-495, 2007.

GUYNN, S.; DOWD, F.; PETZEL, D. Characterization of gill Na/K-ATPase activity and ouabain binding in Antarctic and New Zealand nototheniid fishes. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 131, n. 2, p. 363–374, 2002.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford University Press, Oxford, 2007.

HANDELAND, S. O.; IMSLAND, A. K.; STEFANSSON, S. O. The effect of temperature and fish size on growth, feed intake, food conversion efficiency and stomach evacuation rate of Atlantic salmon post-smolts. **Aquaculture**, v. 283, n. 1–4, p. 36–42, 2008.

HARDEWIG, I.; PÖRTNER, H. O.; VAN DIJK, P. How does the cold stenothermal gadoid *Lota lota* survive high water temperatures during summer? **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 174, n. 2, p. 149–156, 2004.

HARROWER, J.R.; BROWN, C.H. Blood lactic acid. A micromethod adaptes to field collection of microliter samples. **Journal of Applied Physiology**, v. 32, p. 224-228, 1972.

HEISE, K.; ABELE, D. Response of blood parameters of the Antarctic fish *Notothenia coriiceps* (Richardson, 1844) to warming and hypoxia. In: **The Potter Cove coastal ecosystem, Antarctica. Synopsis of research performed 1999-2006 at the Dallmann Laboratory and Jubany Station, King George Island (Isla 25 de Mayo)**. Wiencke, C., Ferreyra, G., Abele, D. Marensi, S.(eds.) **Berichte zur Polarforsch.** 2008.

HOCHACHKA, P. W.; SOMERO, G. N. **Biochemical adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution**. New York: Oxford University Press, 2002.

HOSEINI, S. M.; HEDAYATI, A.; GHELICHPOUR, M. Plasma metabolites, ions and thyroid hormones levels, and hepatic enzymes[U+05F3] activity in Caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*) exposed to waterborne manganese. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 107, p. 84–89, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.05.002>>.

HUDSON, H. A.; BRAUER, P. R.; SCOFIELD, M. A.; PETZEL, D. H. Effects of warm acclimation on serum osmolality, cortisol and hematocrit levels in the Antarctic fish, *Trematomus bernacchii*. **Polar Biology**, v. 31, n. 8, p. 991–997, 2008.

HUNT, B. M.; HOEFLING, K.; CHENG, C. H. C. Annual warming episodes in seawater temperatures in McMurdo Sound in relationship to endogenous ice in notothenioid fish. **Antarctic Science**, v.15, p. 333-338, 2003.

HUREAU, J.C. Biologie de *Chaenichthys rhinoceratus* Richardson, et probleme du sang incolore des Chaenichthyidae, poissons de mers australes. **Bulletin de la Société zoologique de France**, v. 91, p. 735-751, 1966.

HUREAU, J.C. The significance of fish in the marine Antarctic ecosystems. **Polar Biology**, v.14, p. 307-313, 1994.

HWANG, P. P.; LEE, T. H. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 148, n. 3, p. 479–497, 2007.

IPCC. **Climate Change 2014**: impacts, adaptation and vulnerability-contributions of the working group II to the Fifth Assessment Report. Summary for Policymakers, 2014.

ISLAM, Z.; HAYASHI, N.; YAMAMOTO, Y.; DOI, H.; ROMERO, M. F.; HIROSE, S.; KATO, A. Identification and proximal tubular localization of the Mg<sup>2+</sup> transporter, Slc41a1, in a seawater fish. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 305, n. 4, p. R385-R396, 2013.

JAVED, M.; USMANI, N. Stress response of biomolecules (carbohydrate, protein and lipid profiles) in fish *Channa punctatus* inhabiting river polluted by thermal power plant effluent. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 22, n. 2, p. 237–242, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.09.021>>.

JAYASUNDARA, N.; HEALY, T. M.; SOMERO, G. N. Effects of temperature acclimation on cardiorespiratory performance of the Antarctic notothenioid *Trematomus bernacchii*. **Polar Biology**, v. 36, n. 7, p. 1047–1057, 2013.

JHA, A. K.; PAL, A. K.; SAHU, N. P.; KUMAR, S.; MUKHERJEE, S. C. Haemato-immunological responses to dietary yeast RNA,  $\omega$ -3 fatty acid and  $\beta$ -carotene in *Catla catla* juveniles. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 23, n. 5, p. 917–927, 2007.

JIN, Y.; DE VRIES, A.L. Antifreeze glycoprotein levels in Antarctic notothenioid fishes inhabiting different thermal environments and the effect of warm acclimation. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v.144, n.3, p.290-300, 2006.

JOBLING, M. The influences of feeding on the metabolic rate of fishes: a short review. **Journal of Fish Biology**, v. 18, p. 385-400, 1981.

JOHNSTON, I. A. Growth and metabolism in Antarctic fish. **Antarctic Special Topic**, n. December, p. 141–150, 1993.

JOHNSTON, I. A.; BATTRAM, J. Feeding energetics and metabolism in demersal fish species from Antarctic, temperate and tropical environments. **Marine Biology**, v. 115, n. 1, p. 7–14, 1993.

JOHNSTON, I. A.; CALVO, J.; GUDERLEY, H.; FERNANDEZ, D.; PALMER, L. Latitudinal variation in the abundance and oxidative capacities of muscle mitochondria in perciform fishes. **Journal of Experimental Biology**, v. 201, p. 1-12, 1998.

KAMLER, E. Inter – individual and seasonal variability of biological indices in notothenioid fishes from Admiralty Bay , Antarctica. v. 23, n. 3, p. 265–278, 2002.

KAWALL, H. G.; TORRES, J. J.; SIDELL, B. D.; SOMERO, G. N. Metabolic cold adaptation in Antarctic fishes: Evidence from enzymatic activities of brain. **Marine Biology**, v. 140, n. 2, p. 279–286, 2002.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for Several Activities of the Glutathione S transferases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, p. 6183-6188, 1976.

KING J.C.; HARANGOZO, S.A. Climate change in the western Antarctic Peninsula since 1945: observations and possible causes. **Annals of Glaciology**, v. 27, p. 571-575, 1998.

KLEIN, R. D.; BORGES, V. D.; ROSA, C. E.; COLARES, E. P.; ROBALDO, R. B.; MARTINEZ, P. E.; BIANCHINI, A. Effects of increasing temperature on antioxidant defense system and oxidative stress parameters in the Antarctic fish *Notothenia coriiceps* and *Notothenia rossii*. **Journal of Thermal Biology**, v. 68, n. February, p. 110–118, 2017a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jtherbio.2017.02.016>>.

KLEIN, R. D.; ROSA, C. E.; COLARES, E. P.; ROBALDO, R. B.; MARTINEZ, P. E.; BIANCHINI, A. Antioxidant defense system and oxidative status in Antarctic fishes: The sluggish rockcod *Notothenia coriiceps* versus the active marbled notothen *Notothenia rossii*. **Journal of Thermal Biology**, v. 68, n. February, p. 119–127, 2017b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jtherbio.2017.02.013>>.

KNOX, G. A. The biology of the Southern Ocean. Cambridge University Press, Cambridge, p. 444, 1994.

KOCK, K.H. **Antarctic fish and fisheries; Studies in polar research**. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1992.

KULESZ, J. Ichthyofauna of lagoons of the Admiralty Bay (King George Island, Antarctica) in 1997. **Polish Archives of Hydrobiology**, v. 46, n. 2, p.173–184, 1999.

KÜLTZ, D.; SOMERO, G. N. Osmotic and thermal effects on in situ ATPase activity in permeabilized gill epithelial cells of the fish *Gillichthys mirabilis*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 198, p. 1883-1894, 1995.

KUMAR, S.; SAHU, N. P.; PAL, A. K.; CHOUDHURY, D.; YENGKOKPAM, S.; MUKHERJEE, S. C. Effect of dietary carbohydrate on haematology, respiratory

burst activity and histological changes in *L. rohita* juveniles. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 19, n. 4, p. 331–344, 2005.

KUMAR, P.; PAL, A. K.; SAHU, N. P.; JHA, A. K.; PRIYA, P. Biochemical and physiological stress responses to heat shock and their recovery in *Labeo rohita* fingerlings. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 85, p. 485–490, 2015.

LA MESA, M.; EASTMAN, J. T.; LICANDRO, P. Feeding habits of *Bathyraco marri* (Pisces, Notothenioidei, Bathyracidae) from the Ross Sea, Antarctica. **Polar Biology**, v. 30, p. 541–547, 2006.

LANNIG, G.; STORCH, D.; PÖRTNER, H. O. Aerobic mitochondrial capacities in Antarctic and temperate eelpout (Zoarcidae) subjected to warm versus cold acclimation. **Polar Biology**, v. 28, n. 8, p. 575–584, 2005.

LAWS, R. M. **Antarctic Ecology, Volume 2**. Academic Press, 1984.

LEE, J. Y.; ISHIDA, Y.; TAKAHASHI, T.; NAGANUMA, A.; HWANG, G. W. Transport of pyruvate into mitochondria is involved in methylmercury toxicity. **Scientific reports**, v. 6, 21528, 2016.

LEVINE, R. L.; WILLIAMS, J. A.; STADTMAN, E. P.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 233, p. 346–357, 1994.

LI, A. J.; LEUNG, P. T. Y.; BAO, V. W. W.; LUI, G. C. S.; LEUNG, K. M. Y. Temperature-dependent physiological and biochemical responses of the marine medaka *Oryzias melastigma* with consideration of both low and high thermal extremes. **Journal of Thermal Biology**, v. 54, p. 98–105, 2015.

LIM, C.; KLESZIUS, P. H. Influence of dietary levels of magnesium on growth, tissue mineral content, and resistance of channel catfish *Ictalurus punctatus* challenged with *Edwardsiella ictaluri*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 34, n. 1, p. 18–28, 2003.

LIMA-JUNIOR, S. E.; GOITEIN, R. Fator de condição e ciclo gonadal de fêmeas de *Pimelodus maculatus* (Osteichthyes, Pimelodidae) no rio Piracicaba (SP, Brasil). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 32, p. 87–94, 2006.

LINKOWSKI, T. B.; ŻUKOWSKI, C. Observation on the growth of *Notothenia coriiceps neglecta* Nybelin and *Notothenia rossii marmorata* Fischer in Admiralty Bay (King George Island South Shetland Islands). **Polish Polar Research**, v. 1, p. 155–162, 1980.

LLORET, J. Effects of large-scale habitat variability on condition of demersal exploited fish in the north-western Mediterranean. **ICES Journal of Marine Science**, v. 59, p. 1215–1227, 2002. doi: 10.1006/jmsc.2002.1294

LONDRAVILLE, R. L.; SIDELL, B. D. Ultrastructure of aerobic muscle in antarctic

fishes may contribute to maintenance of diffusive fluxes. **Journal of Experimental Biology**, v. 150, p. 205–220, 1990.

LOWE, C. J.; DAVISON, W. Plasma osmolarity, glucose concentration and erythrocyte responses of two Antarctic nototheniid fishes to acute and chronic thermal change. **Journal of Fish Biology**, v. 67, n. 3, p. 752–766, 2005.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 267–275, 1951.

LU, G. D. The metabolism of piruvic acid in normal and vitamin B-deficient state. I. A rapid specific and sensitive method for the estimation of blood piruvate. **Biochemical Journal**, v. 33, p. 249–254, 1939.

LU, Y.; WU, Z.; SONG, Z.; XIAO, P.; LIU, Y.; ZHANG, P.; YOU, F. Insight into the heat resistance of fish via blood: Effects of heat stress on metabolism, oxidative stress and antioxidant response of olive flounder *Paralichthys olivaceus* and turbot *Scophthalmus maximus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 58, p. 125–135, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2016.09.008>>.

LUSHCHAK, V. I.; BAGNYUKOVA, T. V.; LUSHCHAK, O. V.; STOREY, J. M.; STOREY, K. B. Hypoxia and recovery perturb free radical processes and antioxidant potential in common carp (*Cyprinus carpio*) tissues. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 37, n. 6, p. 1319–1330, 2005.

LUSHCHAK, V. I.; BAGNYUKOVA, T. V. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 2. Antioxidant and associated enzymes. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 143, p. 36–41, 2006a. doi: 10.1016/j.cbpc.2005.11.018

LUSHCHAK, V. I.; BAGNYUKOVA, T. V. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 1. Indices of oxidative stress. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 143, p. 30–35, 2006b. doi: 10.1016/j.cbpc.2005.11.017

MACHADO, C.; ZALESKI, T.; RODRIGUES, E.; CARVALHO, C. dos S.; CADENA, S. M. S. C.; GOZZI, G. J.; KREBSBACH, P.; RIOS, F. S. A.; DONATTI, L. Effect of temperature acclimation on the liver antioxidant defence system of the Antarctic nototheniids *Notothenia coriiceps* and *Notothenia rossii*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 172–173, n. 1, p. 21–28, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2014.02.003>>.

MADEIRA, D.; NARCISO, L.; CABRAL, H. N.; VINAGRE, C.; DINIZ, M. S. Influence of temperature in thermal and oxidative stress responses in estuarine fish. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 166, p. 237–243, 2013



MARK, F. C.; BOCK, C.; PÖRTNER, H. O. Oxygen-limited thermal tolerance in Antarctic fish investigated by MRI and <sup>31</sup>P-MRS. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 283, p.R1254–R1262, 2002.

MARK, F. C.; LUCASSEN, M.; PÖRTNER, H. O. Thermal sensitivity of uncoupling protein expression in polar and temperate fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part D**, v. 1, p. 365–374, 2006.

MARK, F. C.; LUCASSEN, M.; STROBEL, A.; BARRERA-ORO, E.; KOSCHNICK, N.; ZANE, L.; PATARNELLO, T.; PÖRTNER, H. O.; PAPETTI, C. Mitochondrial function in antarctic nototheniids with ND6 translocation. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, 2012.

MARSHALL, W. S.; GROSELL, M. Ion transport, osmoregulation, and acid-base balance. **The Physiology of fishes**, v. 3, p. 177-230, 2006.

MARTINS, C. I. M.; SCHRAMA, J. W.; VERRETH, J. A. J. The relationship between individual differences in feed efficiency and stress response in African catfish *Clarias gariepinus*. **Aquaculture**, v. 256, p. 588-595, 2006.

MCCORMICK, S. D. Endocrine Control of Osmoregulation in Teleost Fish. **American Zoologist**, v. 41, n. 4, p. 781–794, 2001.

MEREDITH, M. P.; KING, J. C. Rapid climate change in the ocean west of the Antarctic Peninsula during the second half of the 20th century. **Geophysical Research Letters**, v. 32, n. 19, p. 1–5, 2005.

METCALF, V. J.; GEMMELL, N. J. Fatty acid transport in cartilaginous fish: Absence of albumin and possible utilization of lipoproteins. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 31, n. 1, p. 55–64, 2005.

MÉTON, I.; CASERAS, A.; FERNÁNDEZ, F.; BAANANTE, I.V. Molecular cloning of hepatic glucose-6-phosphatase catalytic subunit from gilthead sea bream (*Sparus aurata*): response of its mRNA levels and glucokinase expression to refeeding and diet composition. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 138, p.145–153, 2004.

MINTENBECK, K.; BARRERA-ORO, E. R.; BREY, T.; JACOB, U.; KNUST, R.; MARK, F. C.; MOREIRA, E.; STROBEL, A.; ARNTZ, W. E. **Impact of Climate Change on Fishes in Complex Antarctic Ecosystems**. In: Global change in multispecies systems, v. 46, Elsevier, 2012. p. 351-426.

MOMMSEN, T. P.; VIJAYAN, M. M.; MOON, T. W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 9, n. 3, p. 211–268, 1999.

MONTONE, R. C.; TANIGUCHI, S.; COLABUONO, F. I.; MARTINS, C. C.; CIPRO, C. V. Z. et al. Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in penguins of the genus *Pygoscelis* in Admiralty Bay—An

Antarctic specially managed area. **Marine pollution bulletin**, v. 106, n. 1-2, p. 377-382, 2016.

MUELLER, I. A.; GRIM, J. M.; BEERS, J. M.; CROCKETT, E. L.; O'BRIEN, K. M. Inter-relationship between mitochondrial function and susceptibility to oxidative stress in red- and white-blooded Antarctic notothenioid fishes. **Journal of Experimental Biology**, v. 214, n. 22, p. 3732–3741, 2011. Disponível em: <<http://jeb.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jeb.062042>>.

MUELLER, I. A.; DEVOR, D. P.; GRIM, J. M.; BEERS, J. M.; CROCKETT, E. L.; O'BRIEN, K. M. Exposure to critical thermal maxima increases oxidative stress in hearts of white- but not red-blooded Antarctic notothenioid fishes. **Journal of Experimental Biology**, v. 215, n. 20, p. 3655–3664, 2012. Disponível em: <<http://jeb.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jeb.071811>>.

MUELLER, I.; HOFFMAN, M.; DULLEN, K.; O'BRIEN, K. Moderate elevations in temperature do not increase oxidative stress in oxidative muscles of Antarctic notothenioid fishes. **Polar Biology**, v. 37, p. 311-320, 2014.

NAVARRO, I.; GUTIERREZ, J. Fasting and Starvation. In Biochemistry and Molecular Biology of Fishes (Hochachka, P.W. e Mommsen, T.P., eds), New York: Elsevier. 4: 393-433, 1995.

NAVARRO, I.; ROJAS, P.; CAPILLA, E.; ALBALAT, A.; CASTILLO, J.; MONTSERRAT, N.; CODINA, M.; GUTIÉRREZ, J. Insights into insulin and glucagon responses in fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, 27: 205–216, 2002.

NEAR T. J.; PESAVENTO, J. J.; CHENG, C. H. C. Phylogenetic investigations of Antarctic notothenioid fishes (Perciformes: Notothenioidei) using complete gene sequences of the mitochondrial encoded 16 S rRNA. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 32, p.881–891, 2004. Disponível em: <[10.1016/j.ympev.2004.01.002](http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2004.01.002)>.

NELSON D. L.; COX, M. M. Lehninger **Princípios de Bioquímica**. 3ª Edição. São Paulo: Sarvier, 2002.

OGATA, H. Y.; OKU, H. Effects of water velocity on growth performance of juvenile flounder *Paralichthys olivaceus*. **Journal World Aquaculture Society**, v. 31: 225-231.

O'GRADY, S.M.; DE VRIES, A.L. Osmotic and ionic regulation in polar fishes. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.57, p.219-228, 1982.

PANKHURST, N. W. The endocrinology of stress in fish: An environmental perspective. **General and Comparative Endocrinology**, v. 170, n. 2, p. 265–275, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.07.017>>.

PATARNELLO, T.; VERDE, C.; DI PRISCO, G.; BARGELLONI, L.; ZANE, L. How will fish that evolved at constant sub-zero temperatures cope with global

warming? Notothenioids as a case study. **Bioessays**, v. 33, n. 4, p. 260-268, 2011.

PAULINO, M. G.; ROSSI, P. A.; VENTURINI, F. P.; TAVARES, D.; SOUZA, N. E. S.; SAKURAGUI, M. M.; MORAES, G.; TEREZAN, A. P.; FERNANDES, J. B.; GIANI, A.; FERNANDES, M. N. Hepatotoxicity and metabolic effects of cellular extract of cyanobacterium *Radiocystis fernandoi* containing microcystins RR and YR on neotropical fish (*Hoplias malabaricus*). **Chemosphere**, v. 175, p. 431-439, 2017.

PECK, L. S. Ecophysiology of Antarctic marine ectotherms: limits to life. **Polar Biology**, v. 25, p. 31-40, 2002.

PECK, L.S.; WEBB, K.E.; BAILEY, D.M. Extreme sensitivity of biological function to temperature in Antarctic marine species. **Functional Ecology**, v.18, p.625-630, 2004.

PEDRO, J. B.; MARTIN, T.; STEIG, E. J.; JOCHUM, M.; PARK, W.; RASMUSSEN, S. O. Southern Ocean deep convection as a driver of Antarctic warming events. **Geophys Res Lett** 43:2192–2199, 2016. doi: 10.1002/2016GL067861

PERES, H.; COSTAS, B.; PEREZ-JIMENEZ, A.; GUERREIRO, I.; OLIVATELES, A. Reference values for selected hematological and serum biochemical parameters of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) juveniles under intensive aquaculture conditions. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 31, n. 1, p. 65–71, 2015.

PETZEL, D. Drinking in Antarctic fishes. **Polar Biology**, v. 28, n. 10, p. 763–768, 2005.

PODRABSKY, J. E.; SOMERO, G. N. Inducible heat tolerance in Antarctic notothenioid fishes. **Polar Biology**, v. 30, n. 1, p. 39–43, 2006.

POLAKOF, S.; ARJONA, F. J.; SANGIAO-ALVARELLOS, S.; MARTÍN DEL RÍO, M. P.; MANCERA, J. M.; SOENGAS, J. L. Food deprivation alters osmoregulatory and metabolic responses to salinity acclimation in gilthead sea bream *Sparus auratus*. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 176, p. 441-452, 2006.

POLAKOF, S.; MÍGUEZ, J. M.; SOENGAS, J. L. Daily changes in parameters of energy metabolism in liver, white muscle, and gills of rainbow trout: dependence on feeding. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 147, p. 363–374, 2007.

POLEDNÍK, L.; REHULKA, J.; KRANZ, A. PLEDNÍKOVÁ, K.; HLAVÁČ, V.; KAZIHNITKOVÁ, H. Physiological responses of over-wintering common carp (*Cyprinus carpio*) to disturbance by Eurasian otter (*Lutra lutra*). **Fish physiology and biochemistry**, v. 34, n. 3, p. 223-234, 2008.

PÖRTNER, H. O. Climate variation and physiology basis to temperature

dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. **Comparative and Biochemical Physiology**, v. 132A, n. April 2001, p. 739–761, 2002.

PÖRTNER, H. O. Climate variability and the energetic pathways of evolution: The origin of endothermy in mammals and birds. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 77, p. 959-981, 2004. Disponível em: <doi 10.1086/423742>.

PÖRTNER, H.O., MARK, F.C., BOCK, C. Oxygen limited thermal tolerance in fish: Answers obtained by nuclear magnetic resonance techniques. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v.141, p.243-260, 2004.

PÖRTNER, H. O.; LANGENBUCH, M.; MICHAELIDIS, B. Synergistic effects of temperature extremes, hypoxia, and increases in CO<sub>2</sub> on marine animals: From Earth history to global change. **Journal of Geophysical Research Oceans**, v. 110, C09S10, 2005. Disponível em: <doi 10.1029/2004jc002561>.

PÖRTNER, H. O.; LUCASSEN, M.; STORCH, D. Metabolic biochemistry: its role in thermal tolerance and in the capacities of physiological and ecological function. In: Farrell A.P., J. F. Steffensen (Eds.), **The Physiology of Polar Fishes**. Fish Physiology (Randall, D.R., Farrell, A.P., Eds.), v. 22, p. 79-154, 2005.

PÖRTNER, H. O. Climate-dependent evolution of Antarctic ectotherms: An integrative analysis. **Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, v. 53, n. 8–10, p. 1071–1104, 2006.

PÖRTNER, H. O.; KNUST, R. Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. **Science**, v. 315, p. 95-97, 2007.

PÖRTNER, H.O.; PECK, L.; SOMERO, G. Thermal limits and adaptation in marine Antarctic ectotherms: an integrative view. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 362, p. 2233-2258, 2007.

PÖRTNER, H. O.; FARRELL, A. P. Physiology and climate change. **Science** v. 322, p. 690-692, 2008.

PÖRTNER, H.-O. Oxygen- and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems. **Journal of Experimental Biology**, v. 213, n. 6, p. 881–893, 2010. Disponível em: <<http://jeb.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jeb.037523>>.

PRZEPIURA, T. C. S. **Respostas metabólicas do encéfalo de peixes antárticos submetidos ao estresse térmico**. 101 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

RAGA, G.; PICHLER, H. A.; ZALESKI, T.; DA SILVA, F. B. V.; MACHADO, C.; RODRIGUES, E.; KAWALL, H. G.; RIOS, F. S.; DONATTI, L. Ecological and physiological aspects of the antarctic fishes *Notothenia rossii* and *Notothenia coriiceps* in Admiralty Bay, Antarctic Peninsula. **Environmental Biology of Fishes**, v. 98, n. 3, p. 775–788, 2015. Disponível em:

<<http://link.springer.com/10.1007/s10641-014-0311-2>>.

REGOLI, F.; PRINCIPATO, G. B.; BERTOLI, E.; NIGRO, M.; ORLANDO, E. Biochemical characterization of the antioxidant system in the scallop *Adamussium colbecki*, a sentinel organism for monitoring the Antarctic environment. **Polar Biology**, v. 17, p. 251-258, 1997.

REGOLI, F.; NIGRO, M.; BENEDETTI, M.; FATTORINI, D.; GORBI, S. Antioxidant efficiency in early life stages of the Antarctic silverfish, *Pleuragramma antarcticum*: Responsiveness to pro-oxidant conditions of platelet ice and chemical exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 75, p. 43-52, 2005.

RHEE, S. G.; YANG, K. S.; KANG, S. W.; WOO, H. A.; CHANG, T. S. Controlled elimination of intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via post-translational modification. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 7, p. 619-626, 2005.

ROBINSON, E. Antarctic fish: thermal specialists or adaptable generalists? PhD Thesis, University of Canterbury, 2008.

ROBINSON, E.; DAVISON, W. The Antarctic notothenioid fish *Pagothenia borchgrevinki* is thermally flexible: Acclimation changes oxygen consumption. **Polar Biology**, v. 31, n. 3, p. 317-326, 2008.

RODRIGUES JÚNIOR, E. **Impacto do fluoreto na resposta metabólica do peixe antártico *Notothenia rossii* (Richardson, 1844) aclimatado sob condições de estresse térmico e hiposmótico**. 90f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

RODRIGUES, E.; SUDA, C. N. K.; RODRIGUES, E.; DE OLIVEIRA, M. F.; DOS SANTOS CARVALHO, C.; VANI, G. S. Respostas Metabólicas de peixes Antárticos como marcadores de impacto ambiental. **Oecologia Australis**, v. 15, n. 1, p. 124-149, 2011.

RODRIGUES, E.; FEIJÓ-OLIVEIRA, M.; VANI, G. S.; SUDA, C. N. K.; CARVALHO, C. S.; DONATTI, L.; LAVRADO, H. P.; RODRIGUES, E. Interaction of warm acclimation, low salinity, and trophic fluoride on plasmatic constituents of the Antarctic fish *Notothenia rossii* Richardson, 1844. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 6, p. 1591-1601, 2013.

RODRIGUES, E.; FEIJÓ-OLIVEIRA, M.; SUDA, C. N. K.; VANI, G. S.; DONATTI, L.; RODRIGUES, E.; LAVRADO, H. P. Metabolic responses of the Antarctic fishes *Notothenia rossii* and *Notothenia coriiceps* to sewage pollution. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1205-1220, 2015.

ROMÃO, S.; FREIRE, C. A.; FANTA, E. Ionic regulation and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in gills and kidney of the Antarctic aglomerular cod icefish exposed to dilute sea water. **Journal of Fish Biology**, v. 59, n. 2, p. 463-468, 2001.

ROSSI, A.; BACCHETTA, C.; CAZENAVE, J. Effect of thermal stress on

metabolic and oxidative stress biomarkers of *Hoplosternum littorale* (Teleostei, Callichthyidae). **Ecological Indicators**, v. 79, n. April, p. 361–370, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.04.042>>.

ROVER JR, L.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, 24(1): 112-119, 2001.

RUANE, N. M.; HUISMAN, E. A.; KOMEN, J. Plasma cortisol and metabolite level profiles in two isogenic strains of common carp during confinement. **Journal of Fish Biology**, v. 59, n. 1, p. 1-12, 2001.

RYAN, S. N. The effect of chronic heat stress on cortisol levels in the Antarctic fish *Pagothenia borchgrevinki*. **Experientia**, v. 51, n. 8 p. 768–774, 1995.

SABOROWSKI, I. R.; BUCHHOLZ, F. Metabolic properties of Northern krill, *Meganyctiphanes norvegica*, from different climatic zones. II. Enzyme characteristics and activities. **Marine Biology**, v. 140, p. 557-565, 2002.

SANDERSFELD, T.; MARK, F. C.; KNUST, R. Temperature-dependent metabolism in Antarctic fish: Do habitat temperature conditions affect thermal tolerance ranges? **Polar Biology**, v. 40, n. 1, p. 141–149, 2017.

SANGIAO ALVARELLOS, S.; GUZMÁN, J. M.; LÁIZ-CARRIÓN, R.; MÍGUEZ, J. M.; MARTÍN DEL RÍO, M. P.; MANCERA, J. M.; SOENGAS, J. L. Interactive effects of the high stocking density and food deprivation on carbohydrate metabolism in several tissues of gilthead sea bream *Sparus auratus*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 303, p.761–775, 2005.

SCHALES, O.; SCHALES, S. J. A simple and accurate method for the determination of chloride in biological fluids. **Journal of Biological Chemistry**, v. 140, p. 879-884, 1941.

SCHRECK, C. B. Stress and compensation in teleostean fishes: response to social and physical factors. In: Pickering AD, editor. **Stress and fish**. London: Academic Press, p.295-321, 1981.

SCHRECK, C. B.; TORT, L.; FARREL, A. P.; BRAUNER, C. J. **Biology of Stress in Fish**. Academic Press, 2016.

SCHIELZETH, H. Simple means to improve the interpretability of regression coefficient. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 1, p. 103- 113, 2010.

SECOR, S. M. Specific dynamic action: a review of the postprandial metabolic response. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 179, p. 1–56, 2009.

SEDILAK, J.; LINDSAY, R.H.C. Estimation of total, protein bound and nonprotein sulphhydryl groups in tissue with Ellmann's reagent. **Analytical Biochemistry**, 25: 192–205, 1968.

SEEBACHER, F.; DAVISON, W.; LOWE, C. J.; FRANKLIN, C. E. A falsification of the thermal specialization paradigm: compensation for elevated temperatures in Antarctic fishes. **Biology Letters**, v. 1, n. 2, p. 151–4, 2005. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1626235&tool=pmc&rendertype=abstract>>.

SICINSKI, J.; JAZDZEWSKI, K.; DE BROYER, C.; PRESLER, P.; LIGOWSKI, R.; NONATO, E.; CORBISIER, T.; PETTI, M.; BRITO, T.; LAVRADO, H.; BLAZEWICZ-PASZKOWYCS, M.; PABIS, K.; JAZDZEWSKA, A.; CAMPOS, L. Admiralty Bay Benthos Diversity - A census of a complex polar ecosystem. **Deep-Sea Research II**, v. 58, p. 30-48, 2011.

SIDELL, B.D. Intracellular oxygen diffusion: the roles of myoglobin and lipid at cold body temperature. **Journal of Experimental Biology**, 201:1118–1127, 1998.

SK, U.H.; BHATTACHARYA, S. Prevention of cadmium induced lipid peroxidation, depletion of some antioxidative enzymes and glutathione by series of novel organoselenocyanates **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 22:298–308, 2006.

SMITH, R.N. The freezing resistance of antarctic fish: I Serum composition and its relation to freezing resistance. **British Antarctic Survey Bulletin**, p.1-10, 1972.

SOKOLOVA, I. M.; FREDERICH, M.; BAGWE, R.; LANNIG, G.; SUKHOTIN, A. A. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. **Marine Environmental Research**, v. 79, p. 1–15, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.04.003>>.

SOMERO, G. N.; DE VRIES, A. L. Temperature tolerance of some antarctic fishes. **Science**, v. 156, p. 257, 1967.

SOMERO, G. N. Adaptation of enzymes to temperature: searching for basic "strategies". **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v.139, n.3, p.321-333, 2004.

SOMERO, G.N. The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine “winners” and “losers”. **The Journal of Experimental Biology**, v.213, p. 912-920, 2010.

SOUZA, M. R. D. P.; HERRERIAS, T.; ZALESKI, T.; FORGATI, M.; KANDALSKI, P. K.; MACHADO, C.; SILVA, D. T.; PIECHNIK, C. A.; MOURA, M. O.; DONATTI, L. Heat stress in the heart and muscle of the Antarctic fishes *Notothenia rossii* and *Notothenia coriiceps*: Carbohydrate metabolism and antioxidant defence. **Biochimie**, v. 146, p. 43-55, 2018. doi: 10.1016/j.biochi.2017.11.010.

SPENCE, P.; HOLMES, R. M.; HOGG, A. M.; GRIFFIES, S. M.; STEWART, K. D.; ENGLAND, M. H. Localized rapid warming of West Antarctic subsurface

waters by remote winds. **Nature Climate Change**, v. 7, n. 8, p. 595–603, 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nclimate3335>>.

STROBEL, A.; BENNECKE, S.; LEO, E.; MINTENBECK, K.; PÖRTNER, H. O.; MARK, F. C. Metabolic shifts in the Antarctic fish *Notothenia rossii* in response to rising temperature and PCO<sub>2</sub>. **Frontiers in Zoology**, v. 9, n. 1, p. 28, 2012.

STROBEL, A.; GRAEVE, M.; PÖRTNER, H. O.; MARK, F. C. Mitochondrial acclimation capacities to ocean warming and acidification are limited in the Antarctic nototheniid fish, *Notothenia rossii* and *Lepidonotothen squamifrons*. **PLoS ONE**, v. 8, e68865, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0068865.

STROBEL, A.; LEO, E.; PÖRTNER, H. O.; MARK, F. C. Elevated temperature and PCO<sub>2</sub> shift metabolic pathways in differentially oxidative tissues of *Notothenia rossii*. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, v. 166, p. 48–57, 2013.

STUCK, K. C. et al. Relationship between BP (*Baculovirus penaei*) and energy reserves in larval and postlarval Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 24, n. 3, p. 191–198, 1996.

SUAREZ, R.K.; MOMMSEN, T.P. Gluconeogenesis in teleost fishes. **Canadian Journal of Zoology**, 65: 1869–1882, 1987.

TAKEI, Y.; HWANG, P. P. Homeostatic responses to osmotic stress. In: **Fish Physiology**. Academic Press, 2016. p. 207–249.

TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M. L.; MORAES, F. R. Relação hepatossomática em peixes teleósteos de cultivo intensivo. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 17, 273–281, 2000.

THORNE, M. A. S.; BURNS, G.; FRASER, K. P. P.; HILLYARD, G.; CLARK, M. S. Transcription profiling of acute temperature stress in the Antarctic plunderfish *Harpagifer antarcticus*. **Marine Genomics**, v. 3, n. 1, p. 35–44, 2010.

THUESEN, E. V.; MCCULLOUGH, K. D.; CHILDRESS, J. J. Metabolic enzyme activities in swimming muscle of medusae: is the scaling of glycolytic activity related to oxygen availability? **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 85, p. 603–611, 2005.

TIPSMARK, C. K.; MADSEN, S. S. Rapid modulation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity in osmoregulatory tissues of a salmonid fish. **The Journal of experimental biology**, v. 204, n. Pt 4, p. 701–9, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11171352>>.

TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 6, p. 24–5, 1969.

TSENG, Y. C.; HWANG, P. P. Some insights into energy metabolism for



osmoregulation in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 148, n. 4, p. 419–429, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.04.009>>.

TURNER, J.; COLWELL, S.R.; MARSHALL, G.J.; LACHLAN-COPE, T.A.; CARLETON, A.M.; JONES, P.D.; LAGUN, V.; REID, P.A.; IAGOVKINA, A. S. Antarctic climate change during the last 50 years. **International Journal of Climatology**, v.25, p.279-294, 2005.

TURNER, J.; BARRAND, N. E.; BRACEGIRDLE, T. J.; CONVEY, P.; HODGSON, D. A.; JARVIS, M.; JENKINS, A.; MARSHALL, G.; MEREDITH, M. P.; ROSCOE, H.; SHANKLIN, J. Antarctic climate change and the environment: an update. **Polar Record** (Gr Brit) v. 50, p. 237–259, 2014. doi: 10.1017/S0032247413000296

URSCHEL, M. R.; O'BRIEN, K. M. Mitochondrial function in Antarctic notothenioid fishes that differ in the expression of oxygen-binding proteins. **Polar biology**, v. 32, n. 9, p. 1323-1330, 2009.

VAN DIJK, P. L. M.; TESCH, C.; HARDEWIG, I.; PÖRTNER, H. O. Physiological disturbances at critically high temperatures: a comparison between stenothermal Antarctic and eurythermal temperate eelpouts (Zoarcidae). **Journal of Experimental Biology**, v. 202, p.3611–3621, 1999.

VAN DE NIEUWEGIESSEN, P. G.; BOERLAGE, A. S.; VERRETH, J. A. J.; SCHRAMA, J. W. Assessing the effects of a chronic stressor, stocking density, on welfare indicators of juvenile African catfish, *Clarias gariepinus* Burchell. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 115, p. 233-243, 2008.

VANELLA, F. A.; BOY, C. C.; LATTUCA, M. E.; CALVO, J. Temperature influence on post-prandial metabolic rate of sub-Antarctic teleost fish. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 156, n. 2, p. 247–254, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.02.006>>.

VAUGHAN, D. G.; VAUGHAN, D. G.; MARSHALL, G. J.; CONNOLLEY, W. M.; PARKINSON, C.; MULVANEY, R.; HODGSON, D. A.; KING, J. C.; PUDSEY, C. J.; TURNER, J. Recent rapid regional climate warming on the Antarctic Peninsula. **Climatic change**, v. 60, n. 3, p. 243-274, 2003.

VAZZOLER, A. E. A. M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Universidade Estadual de Maringá, Editora, 1996.

VERDE, C.; PARISI, E.; DI PRISCO, G. The evolution of thermal adaptation in polar fish. **Gene**, v. 385, p. 137–145, 2006.

VERDE, C.; GIORDANO, D.; RUSSO, R.; RICCIO, A.; COPPOLA D.; DI PRISCO, G. Evolutionary adaptations in antarctic fish: the oxygen-transport system. **Oecologia Australis**, v. 15, p. 40-50, 2011.

VIJAYAN, M. M.; REDDY, P. K.; LEATHERLAND, J. F.; MOON, T. W. The effects of cortisol on hepatocyte metabolism in rainbow trout: a study using the steroid analogue RU486. **General and Comparative Endocrinology**, v. 96, p. 75-84, 1994.

VINAGRE, C.; MADEIRA, D.; NARCISO, L.; CABRAL, H. N.; DINIZ, M. Effect of temperature on oxidative stress in fish: Lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*. **Ecological Indicators**, 23: 274–279, 2012.

WEATHERLEY, A. H.; GILL, H. S. Dynamics of muscle growth in fish. In WEATHERLEY, AH GILL, HS. The Biology of Fish Growth. Academic Press, Inc., 150-161 p, 1987.

WERNBERG, T.; BENNETT, S.; BABCOCK, R. C.; DE BETTIGNIES, T.; CURE, K.; DEPCZYNSKI, M.; DUFOIS, F.; FROMONT, J.; FULTON, C. J.; HOVEY, R. K.; et al. Climate-driven regime shift of a temperate marine ecosystem. **Science**, v. 353, n. 6295, p. 169-172, 2016.

WHITELEY, N. M.; EGGINTON, S. Antarctic fishes have a limited capacity for catecholamine synthesis. **The Journal of experimental biology**, v. 202, p. 3623–3629, 1999.

WHITTAMORE, J. M.; COOPER, C. a; WILSON, R. W. HCO<sub>2</sub><sup>-</sup> secretion and CaCO<sub>3</sub> precipitation play major roles in intestinal water absorption in marine teleost fish in vivo. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 298, p. R877–R886, 2010.

WHITTAMORE, J. M. Osmoregulation and epithelial water transport: Lessons from the intestine of marine teleost fish. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 182, n. 1, p. 1–39, 2012.

WILSON, R. S.; KUCHEL, L. J.; FRANKLIN, C. E.; DAVISON, W. Turning up the heat on subzero fish: Thermal dependence of sustained swimming in an Antarctic notothenioid. **Journal of Thermal Biology**, v. 27, n. 5, p. 381–386, 2002.

WILSON, R. W.; GROSELL, M. Intestinal bicarbonate secretion in marine teleost fish - source of bicarbonate, pH sensitivity, and consequences for whole animal acid-base and calcium homeostasis. **Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes**, v. 1618, n. 2, p. 163-174, 2003.

WINDISCH, H. S.; KATHÖVER, R.; PÖRTNER, H. O.; FRICKENHAUS, S.; LUCASSEN, M. Thermal acclimation in antarctic fish: Transcriptomic profiling of metabolic pathways. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 301, p.1453-1466, 2011.

WINDISCH, H. S.; FRICKENHAUS, S.; JOHN, U.; KNUST, R.; PÖRTNER, H. O.; LUCASSEN, M. Stress response or beneficial temperature acclimation: Transcriptomic signatures in Antarctic fish (*Pachycara brachycephalum*).

**Molecular Ecology**, v. 23, n. 14, p. 3469–3482, 2014.

YOUNG, P. S.; CECH JR. Effects of different exercise conditioning velocities on the energy reserves and swimming stress responses in young-of-the-year striped bass (*Morone saxatilis*). **Canadian Journal of Fish and Aquatic Sciences**, v. 51, p. 1528-1534, 1994.

ZAFALON-SILVA, B.; ZEBRAL, Y. D.; BIANCHINI, A.; DA ROSA, C. E.; MARINS, L. F.; COLARES, E. P.; MARTINEZ, P. E.; BOBROWSKI, V. L.; ROBALDO, R. B. Erythrocyte nuclear abnormalities and leukocyte profile in the Antarctic fish *Notothernia coriiceps* after exposure to short- and long-term heat stress. **Polar Biology**, v. 40, p. 1755–1760, 2017.